

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 223**

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: **15.03.2013 PCT/US2013/032575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13142382**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13763998 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2828259**

54 Título: **Compuestos de piridopirimidina y su uso como inhibidores de FLT3**

30 Prioridad:

22.03.2012 US 201261614274 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2018

73 Titular/es:

**OSCOTEC, INC. (100.0%)
9th Floor, Tower A, Korea Bio Park 694-1,
Sampyeong-dong, Bundang-gu, Seongnam
Gyeongg-do, 463-400 , KR**

72 Inventor/es:

**KIM, HONG, WOO;
LEE, HEE, KYU;
SONG, HO-JUHN;
LEE, JAEKYOO;
KOH, JONG, SUNG;
KIM, JUNG-HO;
KIM, SE, WON y
LEE, IN, YONG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 694 223 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 piridopirimidina y su uso como inhibidores de FLT3

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 61/614.274, presentada el 22 de marzo de 2012.

10 **Antecedentes de la invención**

La FLT3 (tirosina quinasa 3 de tipo FMS, también conocida como Flk2) es un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa tipo III (RTK) y desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas. La mutación activadora o la expresión en exceso de este receptor se encuentran en la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia linfocítica aguda (LLA), la mastocitosis y el tumor del estroma gastrointestinal (GIST). Además de activar mutaciones, la estimulación autocrina o paracrina por ligando de FLT3 de tipo salvaje expresado en exceso puede contribuir al fenotipo maligno.

El ligando para FLT3 es expresado por las células del estroma de la médula ósea y otras células y presenta un efecto sinérgico con otros factores de crecimiento para estimular la proliferación de células madre, células progenitoras, células dendríticas y células asesinas naturales. FLT3 se ha involucrado en trastornos hematopoyéticos que son trastornos premalignos, incluyendo trastornos mieloproliferativos, tales como trombocitemia, trombocitosis esencial (TE), metaplasia mieloide angiogénica, mielofibrosis (MF), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM), mielofibrosis idiopática crónica y policitemia vera (PV), las citopenias y los síndromes mielodisplásicos premalignos. Las neoplasias malignas hematológicas incluyen leucemias, linfomas (linfoma no Hodgkin), enfermedad de Hodgkin (también llamada linfoma de Hodgkin) y mieloma, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia neutrofilica crónica (LNC), leucemia indiferenciada aguda (LIA), linfoma anaplásico de células grandes (LACG), leucemia prolinfocítica (LPM), leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJL), LLA de células T adultas, LMA con mielodisplasia trilineaje (LMA/SMDT), leucemia de linaje mixto (LLM), síndromes mielodisplásicos (SMD), trastornos mieloproliferativos (TMP), mieloma múltiple (MM) y sarcoma mieloide. Se ha documentado la expresión aberrante de FLT3 en leucemias tanto adultas como infantiles, que incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), LMA con mielodisplasia trilineaje (LMA/SMDT), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y síndrome mielodisplásico (SMD).

El receptor FLT3 también se expresa en una gran parte de los progenitores de células dendríticas, y la estimulación del receptor provoca la proliferación y diferenciación de estos progenitores en células dendríticas (CD). Dado que las células dendríticas son los principales iniciadores de la respuesta inmunitaria mediada por células T, incluyendo la respuesta inmunitaria autorreactiva, la inhibición de FLT3 es un mecanismo para regular a la baja las respuestas inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por CD. Un estudio muestra que el inhibidor de FLT3 CEP-701 es eficaz para reducir la pérdida de mielina en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo de ratón para la esclerosis múltiple. Se ha encontrado un alto nivel del ligando FLT3 en el suero de pacientes con histiocitosis de células de Langerhans y lupus eritematoso sistémico, lo que implica adicionalmente la señalización de FLT3 en la desregulación de los progenitores de células dendríticas en esas enfermedades autoinmunitarias (Rolland et al., J. Immunol., 2005, 174: 3067-3071).

El receptor protooncogénico de tirosina quinasa (RTK) MER (también conocido como MERTK, Nyk y Tyro12) es un miembro de la familia de quinasas receptoras MER/AXL/TYRO3. Dentro de los linajes hematopoyéticos, MER se expresa en células dendríticas, monocitos/macrófagos, células NK, células NKT, megacariocitos y plaquetas. Sin embargo, MER no se expresa en linfocitos normales. En estudios de LLA de células T, se demostró que la expresión ectópica de MER contribuye al desarrollo de la leucemia linfoblástica y el linfoma. La expresión de ARN de MER también se ha demostrado en LLA-B E2A-PBX1⁺. Se sabe que MER activa las proteínas de señalización antiapoptóticas, incluyendo Akt y Erk 1/2. Además, un estudio reciente de micromatrices identificó *gas6*, un ligando para MER, como un gen que promueve la supervivencia de las células HEK-293 en condiciones de extracción de suero. La expresión ectópica de MER se encontró en la LLA de células B pediátrica. La inhibición de MER evitó la activación de Erk 1/2, aumentó la sensibilidad de las células B de LLA a los agentes citotóxicos in vitro al promover la apoptosis y retrasó el inicio de la enfermedad en un modelo de ratón de leucemia. Además, se descubrió una comunicación cruzada entre MER y la diana de rapamicina (mTOR) de los mamíferos. Recientemente se prestó atención a MER como una diana terapéutica novedosa en LLA (Linger et al., Blood, 2009, 114(13):2678-87). La expresión anormal y la activación de MER proporcionan una ventaja de supervivencia para las células leucémicas. Además, la inhibición de MER puede aumentar la sensibilidad de las células leucémicas a los agentes citotóxicos.

VEGFR3 (receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular, también conocido como FLT4, PCL) es un receptor de tirosina quinasa de la familia VEGFR 1, 2, 3 para los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

C y D, y desempeña un papel importante en la linfangiogénesis y el mantenimiento del endotelio linfático. VEGF es una proteína de señalización involucrada en la regulación de la angiogénesis y la vasculogénesis. También se sabe que el eje VEGF-C/VEGFR-3 es expresado no solo por las células endoteliales linfáticas sino también por una variedad de células tumorales humanas. La activación del eje VEGF-C/VEGFR-3 en células endoteliales linfáticas puede facilitar la metástasis al aumentar la formación de vasos linfáticos (linfangiogénesis) dentro y alrededor de los tumores. El eje VEGF-C/VEGFR-3 desempeña un papel crítico en la proliferación de células leucémicas, la supervivencia y la resistencia a la quimioterapia. Además, se encontró que el eje VEGF-C/VEGFR-3 activado mejora la movilidad de las células cancerosas y las capacidades de invasión, promoviendo la metástasis de las células cancerosas en varios tipos de tumores sólidos como el cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de endometrio y mesotelioma (Su et al., Br. J. Cancer. 2007 96(4):541-5).

Aurora-B (también conocida como serina/treonina quinasa 12 y ARK2), uno de los miembros de la familia de Aurora A, B, C, es una serina/treonina quinasa intracelular, que se sabe que está involucrada directamente en la regulación de la escisión de los microtúbulos del huso polar y es un regulador clave para el inicio de la citocinesis durante la mitosis. Una diana importante de Aurora B es la histona H3, que es un regulador crítico de la condensación del cromosoma. Las aurora quinastas han sido fuertemente vinculadas a la progresión de los cánceres humanos. La expresión en exceso de Aurora A y B se observa en muchos cánceres tales como los cánceres de próstata, colon, páncreas, mama y tiroides. También se encontró que las células hematológicas malignas, incluyendo las de la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloide crónica (LMC) expresaban de forma aberrante las quinastas Aurora A y B (Ikezoe et al., Blood, 2006, 108:563a).

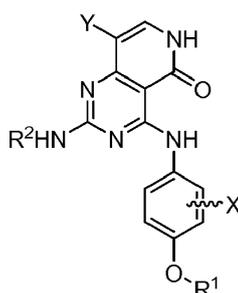
Las proteína quinastas son dianas atractivas y probadas para nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas, con ejemplos que incluyen Gleevec y Tarceva. Las quinastas FLT-3, MER, VEGFR y Aurora-B son especialmente atractivas debido a su asociación con numerosos cánceres humanos, en particular leucemia y linfoma, y su papel en la proliferación de estas células cancerosas.

El documento WO2011053861 describe inhibidores de quinasa que muestran actividad inhibitoria contra múltiples quinastas que incluyen pero no se limitan a FLT3 (tirosina quinasa de tipo FMS).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar compuestos adicionales que tengan una potente actividad contra las enzimas FLT3, una mayor selectividad para otras quinastas y un buen perfil farmacocinético para que sean útiles para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con FLT3.

Compendio de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se describe adicionalmente, pero no es parte de la invención, un compuesto de Fórmula I, así como los estereoisómeros individuales, las mezclas de isómeros, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.



Fórmula (I)

en donde:

- 45 R^1 es arilo, arilalquilo, cicloalquilo C_5-C_6 o cicloalquil(C_5-C_6)metilo opcionalmente sustituido con R^3 ,
 R^3 es independientemente flúor, cloro, bromo, yodo, alquilo C_1-C_6 ,
o CF_3 ;
X es F, Cl, Br, I, CH_3 o CF_3 ;
Y es cloro, bromo, yodo, alquilo C_1-C_3 o fenilo;
50 R^2 es cicloalquilo C_3-C_6 o heterocicloalquilo C_4-C_7 , en donde el cicloalquilo C_3-C_6 está opcionalmente sustituido en los átomos de carbono con 1 o 2 R^4 , y en donde el heterocicloalquilo C_4-C_7 tiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, azufre, sulfona o sulfóxido, y está

sustituido independientemente en el carbono con R⁴ o en el nitrógeno con R⁵;
 R⁴ es hidroxilo, hidroxilalquilo C₁-C₆, amino, aminoalquilo C₁-C₆, NH-alquilo C₁-C₃, N-(alquilo C₁-C₃)₂, alquilo C₁-C₃ o halo;

R⁵ es H, alquilo C₁-C₃ o C(O)-alquilo C₁-C₃, en donde el grupo alquilo C₁-C₃ está opcionalmente sustituido con 1-3 átomos de flúor;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de la presente invención y de Fórmula (I) son útiles para inhibir una o más proteína quinasas y para tratar enfermedades y trastornos que están mediados por las proteína quinasas, tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos de Fórmula (I) son útiles para inhibir la proteína quinasa para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con FLT3.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, tales composiciones farmacéuticas se formulan para administración intravenosa, administración subcutánea, inhalación, administración oral, administración rectal, parenteral, administración intravítrea, administración intramuscular, administración intranasal, administración dérmica, administración tópica, administración óptica, administración oftálmica, administración bucal, administración traqueal, administración bronquial o administración sublingual. En otras realizaciones, semejante composición farmacéutica se formula en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, un líquido, un inhalante, una solución para pulverización nasal, un supositorio, una solución, un gel, una emulsión, una pomada, gotas para los ojos o gotas para los oídos.

Más detalladamente, pero sin formar parte de la presente invención, se describen métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección proliferativas de las células, tal como el cáncer, que comprenden administrar a un sujeto que necesita semejante tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula (I) o sales, composiciones farmacéuticas o medicamentos del mismo farmacéuticamente aceptables, en donde la enfermedad o afección proliferativa celular incluye, por ejemplo, linfoma, osteosarcoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer neuronal, cáncer de pulmón, cáncer de útero o cáncer gastrointestinal. Se describen adicionalmente, pero no forman parte de la presente invención, métodos para inhibir el crecimiento de células cancerosas con el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Más detalladamente, pero sin formar parte de la presente invención, se describen métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección mediadas por la proteína quinasa, que comprenden administrar a un sujeto que necesita semejante tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable, una composición farmacéutica o un medicamento de la misma. La proteína quinasa incluye, pero no se limita a, FLT3 (incluyendo formas mutantes tales como FLT3 D835Y), MER, VEGF1 y Aurora-B.

En ciertas realizaciones, las enfermedades o afecciones mediadas por la proteína quinasa son enfermedades o afecciones inflamatorias, enfermedades respiratorias o enfermedades o afecciones autoinmunitarias, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis, dermatitis, rinitis alérgica, psoriasis, esclerodermia, urticaria, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, cáncer, cáncer de mama, enfermedades asociadas al VIH o lupus.

Más detalladamente, pero sin formar parte de la presente invención, se describen métodos para inhibir las proteína quinasas, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable o una composición farmacéutica del mismo. La proteína quinasa incluye, pero no se limita a, FLT3, MER, VEGF1 y Aurora-B, así como las formas mutantes tales como FLT3-D835Y.

Se describen con más detalle, pero sin formar parte de la presente invención, métodos para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular administrando a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable. Dicha enfermedad cardiovascular afecta al corazón o los vasos sanguíneos e incluye, por ejemplo, aterosclerosis, arritmia, angina, isquemia miocárdica, infarto de miocardio, aneurisma cardíaco o vascular, vasculitis, accidente cerebrovascular, arteriopatía obstructiva periférica de una extremidad, un órgano o un tejido, lesión por reperfusión después de la isquemia de un órgano o tejido, choque endotóxico, quirúrgico o traumático, hipertensión, enfermedad cardíaca valvular, insuficiencia cardíaca, presión arterial anormal, vasoconstricción, anomalía vascular, o inflamación.

Más detalladamente, pero sin formar parte de la presente invención, se describen métodos para el tratamiento de una enfermedad o afección mediadas por quinasa administrando a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable combinados con un segundo agente terapéutico.

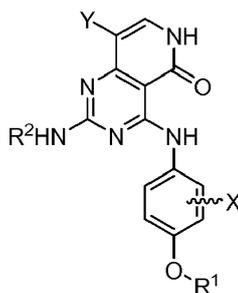
En los métodos anteriores para la utilización del compuesto de la invención, el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable se administran a un sistema que comprende células o tejidos. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I), una sal farmacéuticamente aceptable, una composición farmacéutica o un medicamento del mismo se administran a un sujeto humano o animal.

La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden estos compuestos a través del uso de estos compuestos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un grupo de derivados de 4-fenilamino-pirido[4,3,-d]pirimidin-5-ona y sus sales farmacéuticamente aceptables que son útiles para inhibir una o más proteína quinasas y para tratar enfermedades y trastornos que están mediados por las proteína quinasas, por ejemplo, enfermedad proliferativa celular. Se describen métodos para sintetizar y administrar los derivados de 4-fenilamino-pirido[4,3,-d]pirimidin-5-ona. La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para los mismos. La invención también proporciona compuestos intermedios útiles generados durante la síntesis de compuestos derivados de 4-fenilamino-pirido[4,3,-d]pirimidin-5-ona.

En la presente memoria, pero sin formar parte de la presente invención, se describe una nueva clase de compuestos que tienen la Fórmula (I), y las sales, derivados de N-óxido, derivados de profármacos, derivados protegidos, isómeros individuales y mezclas de isómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos para inhibir las proteína quinasas.



Fórmula (I)

en donde:

R¹ es arilo, arilalquilo, cicloalquilo C₅-C₆ o cicloalquil(C₅-C₆)metilo opcionalmente sustituido con R³;

R³ es independientemente flúor, cloro, bromo, yodo, alquilo C₁-C₆, o CF₃;

X es F, Cl, Br, I, CH₃ o CF₃;

Y es cloro, bromo, yodo, alquilo C₁-C₃ o fenilo;

R² es cicloalquilo C₃-C₆ o heterocicloalquilo C₄-C₇, en donde el cicloalquilo C₃-C₆ está opcionalmente sustituido en los átomos de carbono con 1 o 2 R⁴, y en donde el heterocicloalquilo C₄-C₇ tiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, azufre, sulfona o sulfóxido, y está sustituido independientemente en el carbono con R⁴ o en el nitrógeno con R⁵;

R⁴ es hidroxilo, hidroxilalquilo C₁-C₆, amino, amino alquilo C₁-C₆, NH-alquilo C₁-C₃, N-(alquilo C₁-C₃)₂, alquilo C₁-C₃ o halo;

R⁵ es H, alquilo C₁-C₃ o C(O)-alquilo C₁-C₃, en donde el grupo alquilo C₁-C₃ está opcionalmente sustituido con 1-3 átomos de flúor;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En ciertas realizaciones, R¹ representa fenilo, bencilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentilo metilo o ciclohexil- metilo.

En ciertas realizaciones, R³ representa flúor, cloro, CH₃, o isopropilo.

En ciertas realizaciones, R³ representa H, metilo o F.

En una realización, Y representa cloro, bromo, yodo, metilo o fenilo. En realizaciones adicionales, Y representa cloro o bromo.

En ciertas realizaciones, R⁵ representa metilo. En ciertas realizaciones, R² representa pirrolidinilo o piperidinilo. En ciertas realizaciones, R² representa N-metil-pirrolidinilo o N-metil-piperidinilo.

En ciertas realizaciones, R⁶ representa hidroxilo, hidroxialquilo C₁-C₆, amino, aminoalquilo C₁-C₆ o, NH- alquilo C₁-C₃, N-(alquilo C₁-C₃)₂, alquilo C₁-C₃ o halo. En ciertas realizaciones, R⁶ representa hidroxilo, amino o N-metilamino.

5 El término "alquilo", utilizado solo o como parte de un resto más grande tal como "arilalquilo" o "cicloalquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que tiene de 1 a 15 átomos de carbono o de 1 a 8 átomos de carbono (a menos que se indique lo contrario) e incluye, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, *iso*-pentilo, *n*-hexilo y similares. Un alquilo puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o más sustituyentes adecuados.

10 El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo de anillo hidrocarbonado monocíclico o policíclico e incluye, por ejemplo, ciclopropilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclododecilo, ciclobutilo, adamantilo, norpinanilo, decalinilo, norbornilo, ciclohexilo, ciclopentilo y similares. Un grupo cicloalquilo puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o más sustituyentes adecuados.

15 El término "hetero" se refiere al reemplazo de al menos un miembro del átomo de carbono en un sistema anular con al menos un heteroátomo tal como nitrógeno, azufre y oxígeno.

20 El término "heterocicloalquilo" representa un anillo monocíclico o policíclico no aromático que comprende átomos de carbono e hidrógeno y al menos un heteroátomo, preferiblemente, de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, azufre, oxígeno, sulfona o sulfóxido. Un grupo heterocicloalquilo puede tener uno o más dobles enlaces carbono-carbono o dobles enlaces carbono-heteroátomo en el grupo anular siempre que el grupo anular no se vuelva aromático por su presencia.

25 Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen azetidino, aziridino, pirrolidino, piperidino, piperazino, homopiperazino, morfolino, tiomorfolino, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, tetrahidropiranilo, piranilo y similares. Un grupo heterocicloalquilo puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o más sustituyentes adecuados.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término "halo" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "alcoxi" se refiere a los grupos alquilo anteriores unidos a través de oxígeno, cuyos ejemplos incluyen metoxi, etoxi, *iso*-proxo, *terc*-butoxi, y similares. Además, alcoxi también se refiere a poliéteres tales como -O-(CH₂)₂-O-CH₃, y similares. Un alcoxi puede no estar sustituido o estar sustituido con uno o más sustituyentes adecuados.

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a grupos monocíclicos o policíclicos aromáticos no sustituidos o sustituidos e incluye, por ejemplo, fenilo y naftilo. El término "arilo" también incluye un anillo de fenilo fusionado con un anillo carbocíclico o heterocíclico no aromático. El término "arilo" se puede utilizar indistintamente con "anillo de arilo", "grupo aromático" y "anillo aromático". Los grupos heteroarilo tienen de 4 a 14 átomos, de los cuales 1 a 9 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en oxígeno, azufre y nitrógeno. Los grupos heteroarilo tienen 1-3 heteroátomos en un grupo aromático de 5-8 miembros. Un arilo o heteroarilo puede ser un grupo aromático mono- o bicíclico. Los grupos arilo y heteroarilo típicos incluyen, por ejemplo, fenilo, quinolinilo, indazolilo, indolilo, dihidrobenzodioxinilo, 3-clorofenilo, 2,6-dibromofenilo, piridilo, pirimidinilo, 3-metilpiridilo, benzotienilo, 2,4,6-tribromofenilo, 4-etilbenzotienilo, furanilo, 3,4-dietilfuranilo, naftilo, 4,7-dicloronaftilo, pirrol, pirazol, imidazol, tiazol y similares. El arilo o heteroarilo pueden no estar sustituidos o estar sustituidos con uno o más sustituyentes más adecuados.

50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "haloalquilo" se refiere a cualquier radical alquilo que tenga uno o más átomos de hidrógeno reemplazados por un átomo de halógeno. Los ejemplos de haloalquilo incluyen -CF₃, -CFH₂, -CF₂H, y similares.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "hidroxilo" o "hidroxi" se refiere a -OH.

55 Según se utiliza en la presente memoria, el término "amino" se refiere a -NH₂.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "hidroxialquilo" se refiere a cualquier derivado hidroxilado de radical alquilo. El término "hidroxialquilo" incluye cualquier radical alquilo que tenga uno o más átomos de hidrógeno reemplazados por un grupo hidroxilo.

60 Un "sustituyente", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un resto molecular que está unido covalentemente a un átomo dentro de una molécula de interés. Por ejemplo, un sustituyente anular puede ser un resto tal como un halógeno, un grupo alquilo, un grupo haloalquilo u otro grupo que esté unido covalentemente a un átomo (preferiblemente un átomo de carbono o nitrógeno) que sea un miembro del anillo. Los sustituyentes de grupos aromáticos generalmente están unidos covalentemente a un átomo de carbono del anillo. El término "sustitución" se refiere al reemplazo de un átomo de hidrógeno en una estructura molecular con un sustituyente, de

tal manera que no se exceda la valencia en el átomo designado, y de tal manera que resulte de la sustitución un compuesto químicamente estable (es decir, un compuesto que se puede aislar, caracterizar y someter a prueba para determinar la actividad biológica).

5 Como se describió anteriormente, ciertos grupos pueden estar no sustituidos o estar sustituidos con uno o más sustituyentes adecuados diferentes de hidrógeno en una o más posiciones disponibles, típicamente 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones, con uno o más grupos adecuados (que pueden ser iguales o diferentes). Ciertos grupos, cuando se sustituyen, se sustituyen con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente. Los sustituyentes adecuados incluyen halo, alquilo, haloalquilo, arilo, hidroxilo, alcoxi, hidroxialquilo, amino, y similares.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "quinasa" se refiere a una lista de proteína quinasa, que incluyen, pero no se limitan a, FLT3, MER, Aurora-B, VEGF1 y sus formas mutantes, tales como FLT3 D835Y. Los ensayos de quinasa que contienen las quinasa descritas en la presente memoria están disponibles comercialmente para perfilar bioquímicamente los inhibidores de quinasa para determinar su selectividad. En ciertas realizaciones, una quinasa es una quinasa de mamífero, tal como una quinasa humana.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "trastorno dermatológico" se refiere a un trastorno de la piel. Tales trastornos dermatológicos incluyen, pero no se limitan a, trastornos proliferativos o inflamatorios de la piel, tales como dermatitis atópica, trastornos ampollosos, colagenosis, eccema por dermatitis de contacto, enfermedad de Kawasaki, rosácea, síndrome de Sjogren-Larsson y urticaria.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad respiratoria" se refiere a las enfermedades que afectan a los órganos que participan en la respiración, tales como la nariz, la garganta, la laringe, la tráquea, los bronquios y los pulmones. Las enfermedades respiratorias incluyen, pero no se limitan a, asma, síndrome de dificultad respiratoria en adultos y asma alérgica (extrínseca), asma no alérgica (intrínseca), asma aguda grave, asma crónica, asma clínica, asma nocturna, asma inducida por alérgenos, asma sensible a aspirina, asma inducida por ejercicio, hiperventilación isocápnica, asma infantil, asma en adultos, variante del asma con tos, asma ocupacional, asma resistente a los esteroides, asma estacional, rinitis alérgica estacional, rinitis alérgica perenne, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, incluyendo bronquitis crónica o enfisema, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar intersticial y/o inflamación de las vías respiratorias y fibrosis quística, e hipoxia.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a un crecimiento anormal de células que tienden a proliferar de forma incontrolada y, en algunos casos, a metastatizar. Los tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, tales como los de vejiga, intestino, cerebro, mama, endometrio, corazón, riñón, pulmón, tejido linfático (linfoma), ovario, páncreas u otro órgano endocrino (tiroides), próstata, piel (melanoma) o tumores hematológicos (tales como las leucemias).

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término "trastornos inflamatorios" se refiere a aquellas enfermedades o afecciones que se caracterizan por uno o más de los signos de dolor (dolor, procedentes de la generación de sustancias nocivas y la estimulación de los nervios), calor (calor, procedente de la vasodilatación), enrojecimiento (rubor, procedente de la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo), hinchazón (tumor, procedente del flujo excesivo o la salida restringida de líquido) y pérdida de función, que puede ser parcial o completa, temporal o permanente. La inflamación adopta muchas formas e incluye, pero no se limita a, inflamación que es una o más de las siguientes, aguda, adherente, atrófica, catarral, crónica, cirrótica, difusa, diseminada, exudativa, fibrinosa, fibrosa, focal, granulomatosa, hiperplásica, hipertrófica intersticial, metastásica, necrótica, obliterante, parenquimatosa, plástica, productiva, proliferante, pseudomembranosa, purulenta, esclerosante, seroplástica, serosa, simple, específica, subaguda, supurativa, tóxica, traumática y/o ulcerativa. Los trastornos inflamatorios incluyen además, pero no se limitan a los que afectan a los vasos sanguíneos (poliarteritis, arteritis temporal); articulaciones (artritis: cristalina, osteo-, psoriásica, reactiva, reumatoide, de Reiter); tracto gastrointestinal; piel (dermatitis); o múltiples órganos y tejidos (lupus eritematoso sistémico).

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad cardiovascular" se refiere a enfermedades que afectan el corazón o los vasos sanguíneos o ambos, incluyendo, pero no limitadas a, aterosclerosis, arritmia, angina, isquemia de miocardio, infarto de miocardio, aneurisma cardíaco o vascular, vasculitis, accidente cerebrovascular, arteriopatía obstructiva periférica de una extremidad, órgano o tejido, lesión por reperfusión después de isquemia de un órgano o tejido, choque endotóxico, quirúrgico o traumático, hipertensión, enfermedad valvular cardíaca, insuficiencia cardíaca, presión arterial anormal, vasoconstricción, anomalía vascular o inflamación.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "inhibidor" se refiere a un compuesto que inhibe una o más quinasa descritas en la presente memoria. Por ejemplo, el término "inhibidor de FLT3" se refiere a un compuesto que inhibe el receptor FLT3 o reduce el efecto de señalización.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, tal como un portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades de los compuestos descritos en la

presente memoria. Tales materiales se administran a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que están contenidos.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una formulación de un compuesto que no causa una irritación significativa a un organismo al que se administra y no anula la actividad biológica y las propiedades de los compuestos descritos en la presente memoria.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "combinación farmacéutica" significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en un fármaco activo o "primario" *in vivo*.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad mediada por proteína quinasa" o "trastorno o enfermedad o afección mediados por una actividad inadecuada de proteína quinasa" se refiere a cualquier estado de enfermedad mediado o modulado por las proteínas quinasas descritas en la presente memoria. Tales estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, bronquitis, dermatitis, rinitis alérgica, psoriasis, esclerodermia, urticaria, trastornos ampollosos, colagenosis, eccema de dermatitis de contacto, enfermedad de Kawasaki, rosácea, síndrome de Sjogren-Larsson, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, síndrome inflamatorio del intestino, VIH, lupus, linfoma, osteosarcoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer neuronal, cáncer de pulmón, cáncer uterino, cáncer gastrointestinal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, osteofibrosis, enfermedad de Paget, diabetes, trastornos proliferativos de vasos sanguíneos, enfermedades oculares, enfermedades cardiovasculares, reestenosis, fibrosis, aterosclerosis, arritmia, angina, isquemia miocárdica, infarto de miocardio, aneurisma cardíaco o vascular, vasculitis, accidente cerebrovascular, arteriopatía obstructiva periférica, lesión por reperfusión después de una isquemia de un órgano o un tejido, choque endotóxico, quirúrgico o traumático, hipertensión, enfermedad cardíaca valvular, insuficiencia cardíaca, presión arterial anormal, vasoconstricción, anomalía vascular, rechazo de trasplantes y enfermedades infecciosas incluyendo infecciones virales y fúngicas.

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad mediada por quinasa" o "enfermedad mediada por quinasa" o un "trastorno o enfermedad o afección mediados por una actividad quinasa inapropiada" se refiere a cualquier estado de enfermedad mediado o modulado por un mecanismo de quinasa. Por ejemplo, "enfermedad mediada por FLT3" se refiere a cualquier estado de enfermedad mediado o modulado por los mecanismos de FLT3. Tales estados de enfermedad mediados por FLT3 incluyen, pero no se limitan a, leucemia que incluye leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA), enfermedades inflamatorias, respiratorias, enfermedades autoinmunitarias, esclerosis múltiple, otros trastornos mieloproliferativos, cáncer o una afección asociada con niveles aberrantemente elevados de quinasa FLT3.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad mediada por MER" o "trastorno o enfermedad o afección mediados por una actividad MER inapropiada" se refiere a cualquier estado de enfermedad mediado o modulado por los mecanismos de la quinasa MER. Tales estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, LMA, LLA, tumores sólidos, otros trastornos proliferativos o una afección asociada con niveles aberrantemente elevados de quinasa MER.

50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad mediada por VEGFR3" o un "trastorno o enfermedad o afección mediados por una actividad inadecuada de VEGFR3" se refiere a cualquier estado de enfermedad mediado o modulado por los mecanismos de la quinasa VEGFR3. Tales estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, LMA, LLA, tumores sólidos, otros trastornos proliferativos o una afección asociada con niveles aberrantemente elevados de quinasa VEGFR3.

55 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enfermedad mediada por Aurora B" o un "trastorno o enfermedad o afección mediados por una actividad inadecuada de Aurora B" se refiere a cualquier estado de enfermedad mediado o modulado por los mecanismos de la quinasa Aurora B. Tales estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, LMA, LLA, tumores sólidos, otros trastornos proliferativos, o una afección asociada con niveles aberrantemente elevados de quinasa Aurora B.

60 Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido tal cantidad, da

como resultado un tratamiento, curación, prevención o mejoría de una enfermedad, trastorno, o efecto secundario, o una disminución en la tasa de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para mejorar la función fisiológica normal.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refiere a los métodos para aliviar, calmar o mejorar los síntomas de una enfermedad o afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección de
10 manera profiláctica y/o terapéutica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto (en esta invención, un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y un disolvente. Tales disolventes para los fines de la invención no pueden interferir en la actividad biológica
15 del soluto. Los ejemplos no limitantes de disolventes adecuados incluyen agua, acetona, metanol, etanol y ácido acético. Preferiblemente, el disolvente utilizado es un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitantes de disolventes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, etanol y ácido acético.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" o "paciente" abarca mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, chimpancés, monos primates, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos; conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas y similares. Los ejemplos de los no
20 mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves, peces y similares.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "administración de" o "administrando" el compuesto sujeto se refiere a proporcionar un compuesto de la invención y/o profármacos del mismo a un sujeto que necesita
25 tratamiento.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "portador" se refiere a compuestos químicos o agentes que facilitan la incorporación de un compuesto descrito en la presente memoria a células o tejidos.
30

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente, según se utiliza en la presente memoria, significa que no tiene un efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que se está tratando.

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "diluyente" se refiere a compuestos químicos que se utilizan para diluir un compuesto descrito en la presente memoria antes del suministro. Los diluyentes también se pueden utilizar para estabilizar los compuestos descritos en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de un compuesto descrito en la presente memoria que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que comprende un compuesto como se describe en la presente memoria requerido para proporcionar una disminución clínicamente
45 significativa en los síntomas de la enfermedad. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar utilizando técnicas, tales como un estudio de aumento a escala de la dosis. Solo a modo de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención puede estar en el intervalo de, p.ej., aproximadamente 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día.
50

I. Proteína quinasas humanas

Las proteína quinasas desempeñan un papel central en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares y en el mantenimiento del control sobre la función celular. Las proteína quinasas catalizan y regulan el proceso de fosforilación, mediante el cual las quinasas unen de manera covalente los grupos fosfato a proteínas o dianas lipídicas en respuesta a una variedad de señales extracelulares. Los ejemplos de tales estímulos incluyen hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y diferenciación, eventos del ciclo celular, estrés ambiental y estrés nutricional. Un estímulo extracelular puede afectar a una o más respuestas celulares relacionadas con el crecimiento celular, la migración, la diferenciación, la secreción de hormonas, la activación de factores de transcripción, la
60 contracción muscular, el metabolismo de la glucosa, el control de la síntesis de proteínas y la regulación del ciclo celular.

Los compuestos de la presente invención se examinaron frente al panel de quinasa e inhibieron la actividad de al menos una quinasa en el panel. Los ejemplos de quinasas incluyen, pero no se limitan a, FLT3, MER, Aurora-B,

VEGF1 y formas mutantes, tales como las quinasas FLT3 D835Y. Como tales, los compuestos y composiciones de la invención son útiles para tratar enfermedades o trastornos en los que dichas quinasas contribuyen a la patología y/o sintomatología de una enfermedad o trastorno asociados con tales quinasas. Dichas enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de páncreas, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma de ovario, carcinoma adenoide quístico humano, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama secretor, fibrosarcoma congénito, nefroma mesoblástico congénito, leucemia mielógena aguda, psoriasis, metástasis, dolor relacionado con el cáncer y neuroblastoma, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias, alergias y asma, enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas con las hormonas, trastornos proliferativos benignos y malignos, enfermedades resultantes de la activación inadecuada del sistema inmunológico, enfermedades resultantes de la activación inadecuada del sistema nervioso, rechazo de aloinjertos, enfermedad injerto contra anfitrión, retinopatía diabética, neovascularización coroidea debida a degeneración macular relacionada con la edad, psoriasis, artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, invasión de pannus sinovial en la artritis, esclerosis múltiple, miastenia gravis, diabetes melitus, angiopatía diabética, retinopatía del prematuro, hemangiomas infantiles, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cánceres de vejiga y cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico y pancreático, psoriasis, fibrosis, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad autoinmunitaria, alergia, enfermedades respiratorias, asma, rechazo de trasplantes, inflamación, trombosis, proliferación de vasos retinianos, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedades óseas, trasplante o rechazo de trasplante de médula ósea, lupus, pancreatitis crónica, caquexia, choque séptico, enfermedades o trastornos fibroproliferativos y diferenciados de la piel, enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, trastornos o afecciones relacionados con el daño nervioso y la degeneración del axón posterior a una lesión cerebral o de la médula espinal, cáncer agudo o crónico, enfermedades oculares, infecciones virales, enfermedades cardíacas, enfermedades del pulmón o pulmonares o enfermedades del riñón o renales y bronquitis.

Los compuestos descritos en la presente memoria son inhibidores de la actividad de la quinasa y tienen un beneficio terapéutico en el tratamiento de trastornos asociados con la actividad inapropiada de la quinasa, en particular en el tratamiento y la prevención de estados de enfermedad mediados por la quinasa. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para regular, y en particular inhibir, las cascadas de transducción de señales en las que una quinasa desempeña un papel. El método generalmente implica administrar a un sujeto o poner en contacto una célula que exprese la quinasa con una cantidad eficaz de un compuesto descrito en la presente memoria, profármaco o una sal, hidrato, solvato, N-óxido y/o composición aceptables del mismo, para regular o inhibir la cascada de transducción de la señal. Los métodos también se utilizan para regular, y en particular inhibir, procesos aguas abajo o respuestas celulares provocadas por la activación de la cascada de transducción de señales de la quinasa particular. Los métodos también se ponen en práctica en contextos *in vitro* o en contextos *in vivo* como un enfoque terapéutico hacia el tratamiento o la prevención de enfermedades caracterizadas por, causadas por, o asociadas con la activación de la cascada de transducción de señales dependiente de quinasa.

2. Composiciones farmacéuticas

Para los usos terapéuticos de los compuestos proporcionados en la presente memoria, incluyendo los compuestos de Fórmula (I), o sales, solvatos, *n*-óxidos, profármacos e isómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables, tales compuestos se administran en cantidades terapéuticamente eficaces, solos o como parte de una composición farmacéutica. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden al menos un compuesto proporcionado en la presente memoria, incluyendo al menos un compuesto de Fórmula (I), y/o solvatos de los mismos sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más portadores, diluyentes, coadyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Además, tales compuestos y composiciones se administran individualmente o combinados con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Los métodos de administración de tales compuestos y composiciones incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, inhalación, administración oral, administración rectal, administración parenteral, administración intravítrea, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal, administración dérmica, administración tópica, administración oftálmica, administración bucal, administración traqueal, administración bronquial, administración sublingual o administración ótica. Los compuestos proporcionados en la presente memoria se administran mediante formulaciones farmacéuticas conocidas, que incluyen comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral, supositorios para administración rectal, soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral o intramuscular, lociones, geles, pomadas o cremas para administración tópica, y similares.

La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo, entre otras cosas, de la enfermedad indicada, la gravedad de la enfermedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto administrado, el modo de administración y el tratamiento deseado. La dosis requerida también variará dependiendo del modo de administración, la afección particular a tratar y el efecto deseado.

Las formas de sal farmacéuticamente aceptables incluyen sales ácidas/aniónicas o alcalinas/catiónicas farmacéuticamente aceptables. Las sales ácidas/aniónicas farmacéuticamente aceptables incluyen, sales acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, fumarato, gliceptato, gluconato, glutamato, hexilresorcinato, hidrobromuro, hidroccloruro, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, hidrogenosulfato, tanato, tartrato, teocclato, tosilato y trietyoduro. Las sales alcalinas/catiónicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, dietanolamina, *n*-metilo-*D*-glucamina, *L*-lisina, *L*-arginina, amonio, etanolamina, piperazina y trietanolamina.

Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable se forma por reacción de la base libre en forma de un compuesto de Fórmula (I) con un ácido inorgánico u orgánico adecuado que incluye, pero no se limita a, ácido bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, fórmico, acético, propiónico, fumárico, cítrico, tartárico, láctico, benzoico, salicílico, glutámico, aspártico, *p*-toluensulfónico, bencenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalensulfónico, tal como ácido 2-naftalensulfónico o ácido hexanoico. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) puede comprender o ser, por ejemplo, una sal hidrobromuro, hidroccloruro, sulfato, nitrato, fosfato, succinato, maleato, formiato, acetato, propionato, fumarato, citrato, tartrato, lactato, benzoato, salicilato, glutamato, aspartato, *p*-toluenosulfonato, bencenosulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato, naftalensulfonato (p.ej., 2-naftalensulfonato) o hexanoato.

Las formas de ácido libre o base libre de los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de la sal de adición de base o la sal de adición de ácido correspondiente, respectivamente. Por ejemplo, un compuesto de la invención en forma de sal de adición de ácido se puede convertir en la base libre correspondiente mediante el tratamiento con una base adecuada (p.ej., solución de hidróxido de amonio, hidróxido de sodio y similares). Un compuesto de la invención en forma de sal de adición de base se puede convertir en el ácido libre correspondiente mediante el tratamiento con un ácido adecuado (p.ej., ácido clorhídrico, etc.).

Los derivados profármaco de los compuestos de la invención se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica (p.ej., para más detalles, véase Saulnier et al., (1994), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 4, 1985).

Los derivados protegidos de los compuestos de la invención se pueden preparar por medios conocidos por los expertos en la técnica. Una descripción detallada de las técnicas aplicables a la creación de grupos de protección y su eliminación se puede encontrar en T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry", 3ª edición, John Wiley and Sons, Inc., 1999.

Los compuestos de la invención se pueden preparar en forma de sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisoméricos, separando los diastereoisómeros y recuperando los enantiómeros ópticamente puros. La resolución de los enantiómeros se puede llevar a cabo utilizando derivados diastereoméricos covalentes de los compuestos de la invención, o usando complejos disociables (p.ej., sales diastereoméricas cristalinas). Los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas (p.ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidad, reactividad, etc.) y se pueden separar fácilmente aprovechando estas diferencias. Los diastereómeros se pueden separar por cromatografía, o por técnicas de separación/resolución basadas en diferencias en la solubilidad. El enantiómero ópticamente puro se recupera a continuación, junto con el agente de resolución, por cualquier medio práctico que no dé lugar a racemización. Una descripción más detallada de las técnicas aplicables a la resolución de estereoisómeros de compuestos de su mezcla racémica se puede encontrar en Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions," John Wiley and Sons, Inc., 1981.

Los portadores, diluyentes, coadyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen comprimidos (comprimidos recubiertos) hechos, por ejemplo, de colidona o laca, goma arábica, talco, dióxido de titanio o azúcar, cápsulas (gelatina), soluciones (solución acuosa o acuosa-etanólica), jarabes que contienen los principios activos, emulsiones o polvos inhalables (de varios sacáridos tales como la lactosa o glucosa, sales y mezclas de estos excipientes entre sí) y aerosoles (soluciones para inhalación que contienen propelente o libres de propelente).

Los excipientes que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, tales como parafinas (p.ej., fracciones de petróleo), aceites vegetales (p.ej., aceite de cacahuete o sésamo), alcoholes monofuncionales o polifuncionales (p.ej., etanol o glicerol), portadores tales como polvos minerales naturales (p. ej., caolín, arcillas, talco, tiza), polvos minerales sintéticos (p.ej., ácido silícico y silicatos muy dispersos), azúcares (p.ej., azúcar de caña, lactosa y glucosa), emulsionantes (p.ej., lignina, licores gastados de sulfito, metilcelulosa, almidón y polivinilpirrolidona) y lubricantes (p.ej., estearato de magnesio, talco, ácido esteárico y lauril sulfato de sodio).

Los compuestos de Fórmula (I) se elaboran mediante los procedimientos descritos en la presente memoria y en los Ejemplos. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) se fabrican: (a) opcionalmente convirtiendo un compuesto de la invención en una sal farmacéuticamente aceptable; (c) convirtiendo opcionalmente una forma de sal de un compuesto de la invención en una forma no salina; (d) convirtiendo opcionalmente una forma no oxidada de un compuesto de la invención en un N-óxido farmacéuticamente aceptable; (e) resolviendo opcionalmente un isómero individual de un compuesto de la invención a partir de una mezcla de isómeros; (f) convirtiendo opcionalmente un compuesto no derivatizado de la invención en un derivado profármaco farmacéuticamente aceptable; y (g) convirtiendo opcionalmente un derivado profármaco de un compuesto de la invención en su forma no derivada.

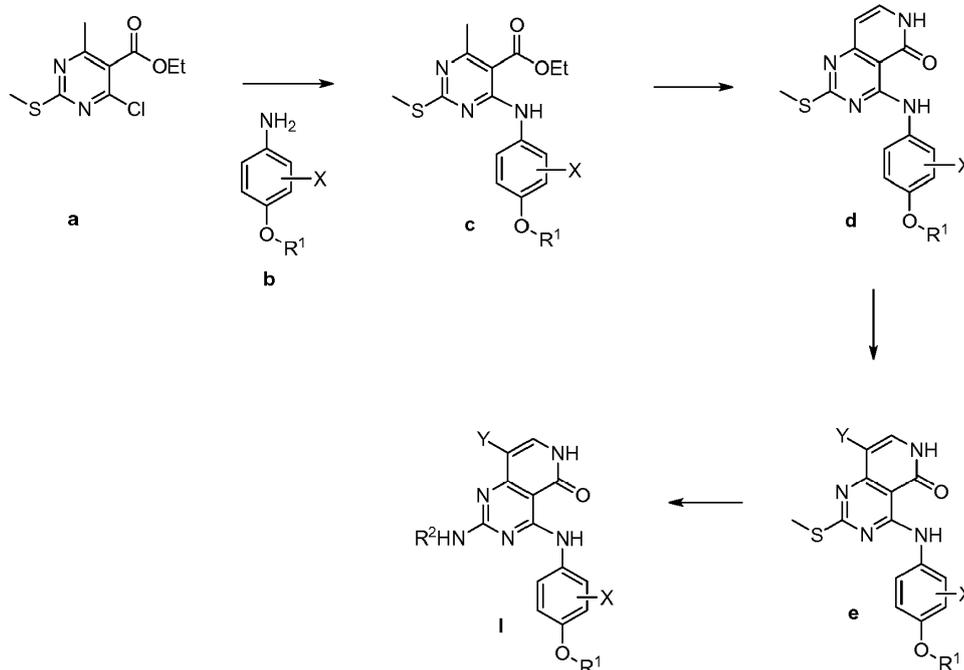
Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que ilustran la preparación de compuestos de Fórmula (I) de acuerdo con la invención. Los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden, ni deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar variaciones y modificaciones sin cambiar el alcance de la invención.

Método de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS):

1. Las muestras se procesan en el sistema Agilent Technologies 6120 MSD con una columna de fase inversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5 μ) (4,6 x 50 mm) a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de 1,5 ml/minuto.
2. La fase móvil utiliza el disolvente A (agua/ácido fórmico al 0,1%) y el disolvente B (acetonitrilo/ácido fórmico al 0,1%): 95%/5% a 0%/100% (A/B) durante 5 minutos.
3. Los espectros de masas (m/z) se registraron utilizando ionización por electropulverización (ESI).
4. Los datos de ionización se redondearon al entero más próximo.

Se describe un método para preparar un compuesto de Fórmula (I) partiendo del compuesto **a** (Esquema 1), que se puede preparar como se describe en Publicación PCT Núm. WO2011053861.



Esquema 1.

El **Compuesto c** se preparó haciendo reaccionar el compuesto **a** con el compuesto **b** en condiciones ácidas (véase el Esquema 1). A continuación, el compuesto **c** se trató con dimetilacetal de N,N-dimetilformamida (DMF DMA) seguido de amoníaco en etanol para producir el compuesto **d**. La preparación del compuesto **e** se logró mediante el uso de N-halosuccinimida. El compuesto **e** se oxidó con oxidante inorgánico formando la correspondiente sulfona. El compuesto de sulfona se sometió a una reacción de acoplamiento con varias aminas R^2NH_2 en presencia de una base orgánica para proporcionar el compuesto de Fórmula (I). La condición de reacción sintética detallada del compuesto (238) se describe a continuación.

4-((4-(3-Fluorofenoxi)fenil)amino)-6-metil-2-(metiltio)pirimidino-5-carboxilato de etilo (238c); Se cargó un vial de reacción de 40 mL con **a** (1,85 g, 7,52 mmoles) y 4-(3-fluorofenoxi)anilina (1,65 g, 8,10 mmoles) en 10 mL de ácido acético. Después de agitar a 100°C durante 2 horas, los compuestos volátiles se eliminaron a presión reducida para dar un residuo marrón. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y a continuación se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio y a continuación se concentró para proporcionar **(239c)** en forma de un residuo de color pardo. El producto bruto resultante se utilizó para la siguiente etapa sin purificación.

4-Metil-2-(metiltio)-6-(4-fenoxifenilamino)pirimidino-5-carboxilato de etilo **(222c)**; se preparó **(222c)** a partir de 4-fenoxibencenammina mediante el método del ejemplo **(238c)**.

4-((4-(3-Fluorofenoxi)fenil)amino)-2-(metiltio)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona (238d); El residuo bruto **(238c)** se disolvió en DMF (5 mL). A esto, se le añadió dimetilacetato de N,N-dimetilformamida (DMF/DMA, 15 mmoles, 1,93 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 130°C durante 16 horas. Los compuestos volátiles se eliminaron a presión reducida produciendo el residuo de color pardo. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se lavó con agua. La capa orgánica separada se condensó para proporcionar un aceite de color pardo. El residuo oleoso resultante se disolvió en etanol caliente en un vial de reacción de 40 mL. A esto, se le añadió una solución de hidróxido de amonio acuoso al 30% (2 mL) y después el vial se tapó bien y se agitó a 100°C durante 4 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente para formar precipitados sólidos. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con etanol produciendo 1,58 g de **238d** en forma de sólidos de color naranja (53% para las tres etapas).

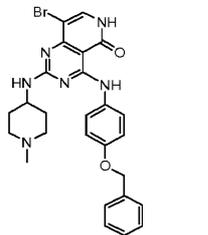
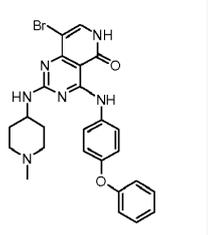
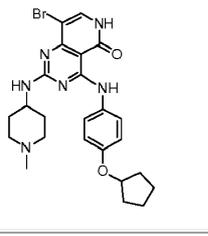
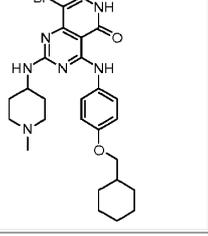
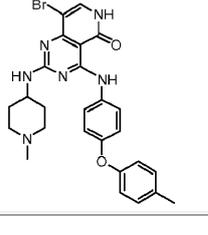
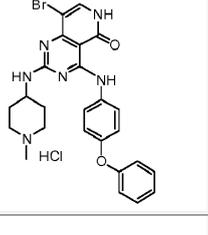
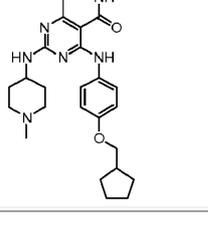
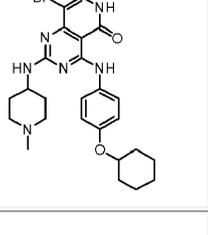
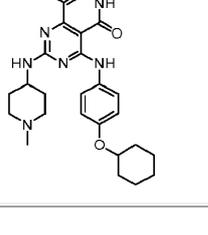
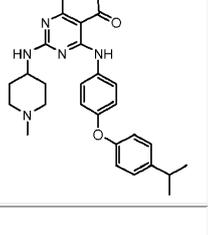
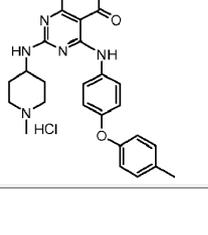
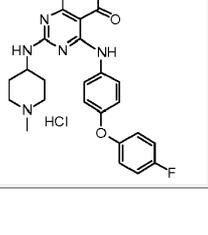
8-Bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-(metiltio)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona (238e); Se cargó un vial de reacción de 40 mL con **238d**, (1,00 g, 2,53 mmoles) en 15 ml de DMF. La mezcla se calentó suavemente hasta que se convirtió en una solución transparente y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadió N-bromosuccinimida (NBS, 498 mg, 2,80 mmoles) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida produciendo el sólido de color naranja. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con acetonitrilo para proporcionar 1,04 g (87%) del producto deseado **238e**.

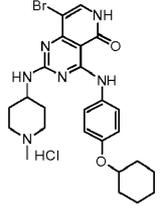
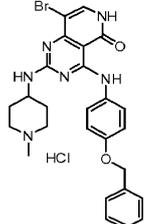
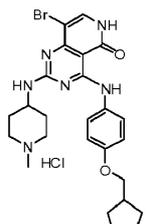
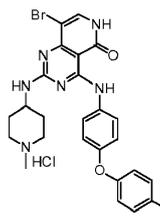
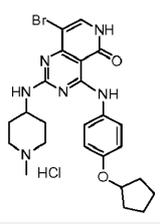
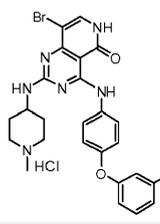
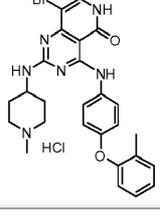
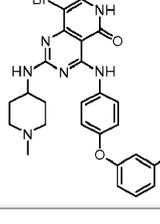
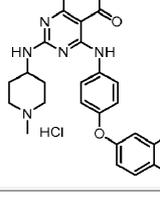
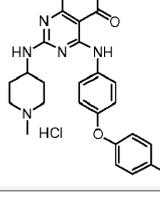
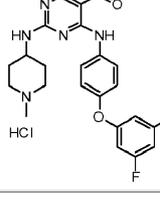
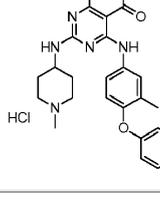
Hidrocloreto de 8-bromo-4-(4-(3-fluorofenoxi)fenilamino)-2-(1-metilpiperidin-4-amino)pirido[4,3-d]-pirimidin-5(6H)-ona e hidrocloreto de 8-bromo-4-(4-(3-fluorofenoxi)fenilamino)-2-(1-metilpiperidin-4-ilamino)-pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona (238); Se cargó un vial de reacción de 40 mL con **238e** (0,90 g, 1,90 mmoles) en 15 mL de DMF. La solución transparente se enfrió a -10°C. A esto, se le añadió m-CPBA (1,48 g, 6,00 mmoles) a -10°C. Se dejó que la reacción se calentara a temperatura ambiente y después se agitó durante 30 minutos adicionales a RT. A la mezcla se le añadió TEA (0,83 mL, 6,00 mmoles) y 1-metilpiperidin-4-amina (685 mg, 6,00 mmoles), y después se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora controlando la reacción por LC-MS. El disolvente se eliminó a presión reducida produciendo un residuo oleoso de color pardo claro. El residuo se disolvió en cloruro de metileno y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica separada se secó sobre sulfato de sodio y después se concentró a presión reducida para producir un sólido. El sólido se disolvió en una cantidad mínima de cloruro de metileno y se trató con un exceso de n-hexanos para producir sólidos de color amarillo pálido. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración, se enjuagaron con n-hexanos y a continuación se secaron al aire proporcionando un sólido amarillo pálido. El sólido se disolvió en la mezcla de DCM y metanol. A la solución transparente se le añadió HCl 4N en dioxano (12,0 ml) y después se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto deseado (**238**, rendimiento 90%).

Hidrocloreto de 8-bromo-2-(1-metilpiperidin-4-ilamino)-4-(4-fenoxifenilamino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona **(226)**; Preparado a partir de **(226c)** por el método de **(238)**. EM (ESI) m/z 521 [M+1]⁺, 523 [M+3]⁺. RMN-H¹ (400M Hz, CDCl₃) δ (ppm) 11,62 (s, 0,7H), 11,42 (s, 0,3H), 11,09 (b, 1H), 7,70-7,79 (m, 2H), 7,56 (m, 1H), 7,32-7,39 (m, 2H), 7,02-7,14 (m, 5H), 5,79 (d, J= 7,32Hz, 0,7H), 5,43 (d, J= 7,04Hz, 0,3H), 3,88 (m, 0,3H), 3,75 (m, 0,7H), 2,90 (m, 2H), 2,01-2,37 (m, 7H), 1,66 (m, 2H).

En la Tabla 1 a continuación, los siguientes compuestos se encuentran dentro del alcance de la presente invención: compuestos 221-243, 245, 246 y 250-252.

Tabla 1.

Núm.	Estructura	MS (ESI +) <i>m/z</i>	Núm.	Estructura	MS (ESI +) <i>m/z</i>
221		535	222		521
223		513	224		541
225		535	226		521
227		527	228		527
229		483	230		563
231		535	232		539

Núm.	Estructura	MS (ESI +) <i>m/z</i>	Núm.	Estructura	MS (ESI +) <i>m/z</i>
233		527	234		535
235		527	236		563
237		513	238		539
239		535	240		539
241		557	242		555
243		557	244		553

Núm.	Estructura	MS (ESI +) <i>m/z</i>	Núm.	Estructura	MS (ESI +) <i>m/z</i>
245		521	246		521
247		539	248		535
249		557	250		549
251		535	252		589

La Tabla 1 muestra las estructuras de los compuestos de Fórmula (I). Ciertos compuestos de fórmula (I) se nombran como sigue: 4-((4-(benzoyloxi)fenil)amino)-8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(ciclohexilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(ciclohexilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-(*p*-toliloxi)fenil)-amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(ciclohexilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-cloro-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(4-isopropilfenoxi)-fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)-amino)-4-((4-(*p*-toliloxi)fenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-4-((4-(4-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 4-((4-(benzoyloxi)fenil)amino)-8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(ciclohexilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-4-((4-(4-isopropilfenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreto de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-(*o*-toliloxi)fenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona;

8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)-amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(3,4-difluorofenoxi)-fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(4-clorofenoxi)fenil)-amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(3,5-difluorofenoxi)-fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)-3-metilfenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((3-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((3-fluoro-4-fenoxifenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-4-((3-metil-4-fenoxifenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; hidrocloreuro de 8-bromo-4-((3-fluoro-4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona; e hidrocloreuro de 8-bromo-2-(metil(1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona, 8-bromo-2-(1-isopropilpiperidin-4-ilamino)-4-(4-fenoxifenilamino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona, 8-bromo-2-(1-etilpiperidin-4-ilamino)-4-(4-fenoxifenilamino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona, 8-bromo-4-(4-fenoxifenilamino)-2-(1-(2,2,2-trifluoroetil)piperidin-4-ilamino)pirido[4,3-d]pirimidino-5(6H)-ona.

Ensayos biológicos

1. Ensayo de inhibición de quinasa

Los compuestos de la presente invención se sometieron a ensayo para medir su capacidad para inhibir las quinasas que incluyen, pero no se limitan a, FLT3 y JAK2.

FLT3 es un miembro de la familia de receptores de tirosina quinasa tipo III (RTK). El ligando para FLT3 es expresado por las células del estroma de la médula ósea y otras células y presenta sinergismo con otros factores de crecimiento para estimular la proliferación de células madre, células progenitoras, células dendríticas y células asesinas naturales. FLT3 se ha implicado en trastornos hematopoyéticos que son trastornos premalignos, incluidos los trastornos mieloproliferativos, tales como la LMA y la LLA.

JAK2 ha sido implicado en la señalización de miembros de la familia de receptores de citoquinas de tipo II (p.ej., receptores de interferón), la familia de receptores GM-CSF (IL-3R, IL-5R y GM-CSF-R), la familia de receptores gp130 (p.ej., IL-6R), y los receptores de cadena sencilla (p.ej., Epo-R, Tpo-R, GH-R, PRL-R). Las fusiones del gen JAK2 con los genes TEL (ETV6) (TEL-JAK2) y PCM1 se han encontrado en pacientes con leucemia. Adicionalmente, las mutaciones en JAK2 se han relacionado con la policitemia vera, la trombocitopenia esencial y otros trastornos mieloproliferativos. Esta mutación, un cambio de valina a fenilalanina en la posición 617, hizo que las células hematopoyéticas fueran más sensibles a los factores de crecimiento, tales como la eritropoyetina y la trombopoyetina.

Métodos

Inhibición de la actividad enzimática de la quinasa FLT3 y JAK2

Los compuestos de la invención se diluyeron inicialmente a 10 mM en DMSO al 100% (CALBIOCHEM™) para su almacenamiento y se llevaron a solución tampón de quinasa para crear una concentración de compuesto que oscilaba entre 1 μ M y 10 μ M. Las diluciones en serie de los compuestos de la invención se dispensaron en una placa de 96 pocillos (GREINER BIOSCIENCES™) a 6 μ L cada una. FLT3 de tipo salvaje truncada, el mutante D835Y y JAK2 (CARNA BIOSCIENCES™) se diluyeron en tampón de quinasa y se añadieron a las soluciones del compuesto y se incubaron previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió ATP (TEKNOVA™) y solución de sustrato (se sugirió la fabricación de sustratos de PerkinElmer™, por ejemplo, el péptido Ulight™-TK para FLT3 de tipo salvaje y el mutante D835Y y Ulight™-JAK1 para JAK2 (PERKINELMER™) a los pocillos que contenían la solución de compuesto y la enzima. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora. Después de la incubación, se añadió la solución de parada elaborada con EDTA, agua y tampón de detección de Lance (PERKINELMER™) (12 μ L cada uno) para detener la fosforilación. Después de la adición de la solución de parada y de 5 minutos de agitación, se añadieron la solución de detección que contenía el anticuerpo marcado con europio (se sugirió la fabricación de sustratos de PerkinElmer™, por ejemplo, PT66 para FLT3 y JAK2), agua y el tampón de detección de Lance (12 μ L cada uno) a la mezcla de reacción y se incubaron de nuevo durante 50 minutos. La fosforilación del sustrato fue una función de la emisión a 665 nm medida después de la adición de la solución de detección y 50 minutos de incubación.

Resultados

Los compuestos de Fórmula (I) mostraron propiedades farmacológicas útiles. Según se utiliza en la presente memoria, una forma de describir la potencia de la actividad inhibitoria (nM) es un valor de la actividad inhibitoria del 50% (CI₅₀) como se muestra en la Tabla 2. Los compuestos de referencia, AC220 (Quizartinib, Ambit), PKC412

(Midostaurin, Novartis) y estaurosporina (inhibidor de la pan-quinasa) se utilizaron para FLT3 para juzgar la actividad inhibidora de los compuestos de Fórmula (I). Un compuesto de referencia, la estaurosporina, un inhibidor de la pan-quinasa, se utilizó de forma independiente para JAK2 para juzgar la selectividad y la actividad inhibidora de los compuestos de Fórmula (I).

Por ejemplo, el compuesto **238** de Fórmula (I), a saber, hidrocloreto de 8-bromo-4-(4-(3-fluorofenoxi)-fenilamino)-2-(1-metilpiperidin-4-ilamino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona, mostró una fuerte inhibición de la actividad quinasa de FLT3 de tipo salvaje y el mutante D835Y, que es el mutante más frecuente que se produjo en el dominio de quinasa FLT3 encontrado en pacientes con LMA. Su potencia en el ensayo bioquímico es superior a la de los inhibidores de FLT3 que se desarrollan clínicamente, AC220 y PKC412. Además, muestra una gran selectividad contra su quinasa JAK2, que es superior a la referencia PKC412. La Tabla 2 ilustra el valor de CI₅₀ de FLT3 y JAK2 por los compuestos representativos de Fórmula (I). Como se muestra en la Tabla 2, los compuestos de referencia, estaurosporina y PKC-412, son multipotentes, lo que sugiere que no hay selectividad entre las quinasas, mientras que los compuestos de la presente invención muestran una mejor potencia y una mejor selectividad que los compuestos de referencia. Además, los compuestos de la presente invención también muestran una mejor selectividad que los indicados con un asterisco y descritos en la técnica anterior de los documentos WO2011053861 y PCT/US2010/056583. Como se muestra en la Tabla 2, los compuestos *8 y *136 muestran una actividad inhibidora de múltiples quinasas similar a la de PKC-412. PKC-412 también es un antagonista ampliamente conocido del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En conjunto, estos datos sugieren que los compuestos de la presente invención mejoran significativamente la selectividad en comparación con los compuestos referidos anteriormente, así como la potencia inhibitoria en FLT3 de tipo salvaje y el mutante D835Y en comparación con los inhibidores de FLT3 conocidos, AC220 y PKC-412.

Los compuestos *8 y *136 descritos en el documento WO2011053861 mostraron múltiples actividades inhibitoras contra varias quinasas sometidas a prueba, incluyendo JAK2. En particular, no mostraron exposición al fármaco en ratas después de la administración oral de 10 mg/kg, lo que sugiere que no fueron absorbidos en el intestino o fueron eliminados extremadamente rápido del organismo.

La Tabla 2 ilustra la inhibición bioquímica de FLT3 y JAK2 por los compuestos representativos de Fórmula (I).

ID compuesto	FLT3 tipo salvaje	JAK2	FLT3- D835Y	ID compuesto	FLT3 tipo salvaje	JAK2	FLT3- D835Y
PKC-412	15,4	116	24,2	223	0,6	153	0,3
Estaurosporina	0,2	0,9	0,3	225	0,3	1521	1,6
*8	0,2	12,7	1,0	226	1,2	281	0,2
*136	0,1	3,9	0,3	228	0,1	129	0,6
*203	0,2	391	18,5	233	0,1	173	0,3
246	0,1	260	1,7	240	1,2	599	1,3
221	0,1	290	0,4	238	1,4	845	0,4
241	1,6	1,050	0,6				

* tres compuestos núm. **8**, **136** y **203** se habían descrito en los documentos WO2011053861 y PCT/LTS2010/056583.

Todos los datos están enumerados en el valor de CI₅₀.

2. Ensayo de viabilidad celular: inhibición de células positivas para FLT3-ITD

Los compuestos de la invención se someten a prueba para determinar sus efectos sobre la inhibición de FLT3-ITD (Duplicación Interna en Tándem) en la línea celular de leucemia aguda humana (MV4-11). FLT3 se expresa principalmente en progenitor hematopoyético inmaduro, así como en células mieloides maduras. Pertenece a la familia de receptores de tirosina quinasa (RTK) de tipo III, incluyendo KIT, FMS y PDGFR. Se activa al unirse a FL, lo que conduce a un aumento de la actividad de la quinasa y la activación de la vía de señalización aguas abajo incluyendo STAT5, Ras y PI3Quinasa.

Las mutaciones de FLT3-ITD en el dominio yuxtamembrana son el defecto molecular observado con mayor frecuencia en la leucemia mielógena aguda (LMA). FLT3-ITD induce la dimerización independiente del ligando, la autofosforilación y la activación constitutiva, y es capaz de transformar células hematopoyéticas. Clínicamente, se sabe que FLT3-ITD aumenta la leucocitosis, aumenta el recuento de blastos, aumenta la tasa de recaída, disminuye la supervivencia libre de enfermedad y disminuye la supervivencia general. Por lo tanto, FLT3-ITD es un objetivo molecular atractivo para la terapia de la LMA.

Métodos

Los compuestos de la invención se sometieron a prueba para determinar el efecto de viabilidad celular en células MV4-11. Para el ensayo de viabilidad celular, se obtuvieron células MV4-11 que expresan FLT3-ITD humana de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Esta línea celular se mantuvo con un medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (HyClone™) que contenía 10 suero de ternera bovino (BCS; Hyclone™) con un suplemento de hierro. Las células MV4-11 se sembraron a 2×10^4 células en placas de cultivo de 96 pocillos, y a continuación se añadió el compuesto diluido seriadamente. Después de un período de incubación de 72 horas a 37°C, se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo ATPLite de 1 etapa (Perkin-Elmer™) que se basa en la cuantificación del ATP a partir de células viables. También se llevó a cabo en paralelo el ensayo acuoso CellTiter (Promega™) como un ensayo ortogonal. Los valores de CI_{50} se calcularon mediante regresión no lineal y se definieron como la concentración necesaria para una reducción de 50 en la luminiscencia o la absorbancia en células de control tratadas frente a las no tratadas (Soporte lógico Prism™).

Resultados

Los datos de inhibición de CI_{50} de los compuestos representativos de Fórmula (I) se muestran en la Tabla 3. Los compuestos de Fórmula (I) mostraron una inhibición de menos de 10 nM a la concentración CI_{50} . Especialmente, el compuesto 237, hidrocloreto de 8-bromo-4-(4-(ciclopentiloxi)fenilamino)-2-(1-metilpiperidin-4-ilamino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona, mostró un nivel de inhibición mayor que los mostrados por la referencia PKC-412 en la línea celular de cáncer MV4-11 inducido por FLT3 ITD. Semejante fuerte actividad antitumoral sugiere que los compuestos de la presente invención tienen un mejor valor terapéutico que la referencia y el compuesto 203 indicados por los asteriscos descritos en la técnica anterior (archivo PCT núm.: PCT/US2010/ 056583).

Tabla 3. Viabilidad celular por la línea celular de cáncer inducido por FLT3-ITD por los compuestos representativos de Fórmula (I).

ID compuesto	Célula MV4-11 (CI_{50})	ID compuesto	Célula MV4-11 (CI_{50})
PKC-412	3,2		
*203	5,8	226	1,3
228	0,8	228	0,8
233	1,4	235	1,6
237	0,5	238	1,9
246	1,4	241	0,9
221	2,4	240	0,5
* no se describió ningún compuesto en los documentos WO2011053861 y PCT/US2010/056583.			

3. Modelo de xenoinjerto: modelos de eficacia pre-clínica.

Con el fin de someter a ensayo si el compuesto de la presente invención muestra suficiente eficacia in vivo, se sometió a prueba en un modelo de ratón de xenoinjerto utilizando la línea celular de cáncer MV4-11.

Métodos

Los compuestos de la invención se sometieron a prueba en un modelo de ratón de xenoinjerto utilizando la línea celular MV4-11 de FLT3-ITD. De los ratones carentes de sistema inmunitario Balb/C de 6 semanas de edad, todos los animales macho se alojaron en jaulas de plástico (4-6 ratones/jaula) que contenían mazorca de maíz y se mantuvieron en una instalación libre de patógenos (20-25°C, 30-70% de humedad) con un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas. El modelo tumoral se estableció mediante inyección subcutánea con suspensión de células MV4-11. Cuando el volumen promedio del tumor alcanzó aproximadamente 400 mm³ (~5 semanas después de la implantación del tumor), los ratones con tumores se asignaron a 2 grupos (9 ratones por cada uno). Se inició el tratamiento con el compuesto 238 a 30 mg/kg cada día y se continuó durante 28 días. Se utilizó el vehículo hidroxil-β-ciclodextrina al 20%. El volumen del tumor se midió dos veces por semana. Cuando proceda, se calculará el porcentaje de regresión tumoral (PTR) para cada grupo mediante la fórmula:

$$PTR = 100 \times (\text{volumen del tumor}_{\text{inicial}} - \text{volumen del tumor}_{\text{final}}) / (\text{volumen del tumor}_{\text{inicial}})$$

Resultados

ES 2 694 223 T3

5 El compuesto representativo 238 de Fórmula (I) que se muestra en la Tabla 4 muestra una regresión del tumor de 74,6% solo después de un tratamiento de 4 días y, finalmente, una regresión completa del tumor después de 11 días de tratamiento con el compuesto. Este resultado sugiere que el compuesto representativo tiene una actividad antitumoral muy potente en el modelo de ratón con xenoinjerto, lo que sugiere que el compuesto de la presente invención es una gran opción terapéutica para enfermedades inducidas por FLT3 desregulada y/o hiperactiva, tales como la LMA y la LLA.

Tabla 4

Medias del volumen tumoral (mm ³)									
Día de tratamiento	1	4	7	11	14	17	21	25	28
Control con vehículo	310,3	525,7	874,7	1341	1736	2301	2764	3279	3813
238	312,8	79,4	27,6	0	0	0	0	0	0
30 mg/kg									
Porcentaje de regresión tumoral (PTR%)									
Día de tratamiento	1	4	7	11	14	17	21	25	28
238	-	74,6	91,2	100	100	100	100	100	100
30 mg/kg									

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre:

- 5 4-((4-(benzyloxi)fenil)amino)-8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido [4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-4-((4-(ciclopentiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-4-((4-(ciclohexilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-(p-toliloxi)fenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 10 hidrocloreuro de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-fenoxi fenil)amino) pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-
 ona;
 8-bromo-4-((4-(ciclopentilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-cloro-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 15 8-bromo-4-((4-(4-isopropilfenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-(p-toliloxi)fenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-
 5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(4-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 20 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(ciclohexiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino) pirido[4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 4-((4-(benciloxi) fenil)amino)-8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-
 5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(ciclopentilmetoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido [4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 25 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(4-isopropilfenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(ciclopentiloxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino) pirido[4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-
 30 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-(o-toliloxi)fenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-
 5(6H)-ona;
 8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino) pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(3,4-difluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-d]
 35 pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(4-clorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 hidrocloreuro de 8-bromo-4-((4-(3,5-difluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)pirido[4,3-
 d]pirimidin-5(6H)-ona;
 40 hidrocloreuro de 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((3-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-
 ona;
 8-bromo-2-(metil(1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((3-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-2-(1-isopropilpiperidin-4-ilamino)-4-(4-fenoxifenilamino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona;
 8-bromo-2-(1-etilpiperidin-4-ilamino)-4-(4-fenoxifenilamino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona; y
 45 8-bromo-4-(4-fenoxifenilamino)-2-(1-(2,2,2-trifluoroetil)piperidin-4-ilamino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es 8-bromo-2-((1-metilpiperidin-4-il)amino)-4-((4-fenoxifenil)amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona o 8-bromo-4-((4-(3-fluorofenoxi)fenil)amino)-2-((1-metilpiperidin-4-il)-amino)pirido[4,3-d]pirimidin-5(6H)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un compuesto estereoisomérico de la reivindicación 1.

4. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 1 combinados con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

5. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inhibición de la actividad de FLT3.

6. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una neoplasia maligna hematológica, en donde la neoplasia maligna hematológica se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC) y trastornos mieloproliferativos (MPD).

7. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho compuesto o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo son para administración única o para administración combinada con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

- 5 8. El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo son para administración por vía intravenosa, administración subcutánea, inhalación, administración oral, administración rectal, parenteral, administración intravítrea, administración intramuscular, administración intranasal, administración dérmica, administración tópica, administración óptica, administración oftálmica, administración bucal, administración traqueal, administración bronquial o administración sublingual.