

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 382**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/GB2016/051057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16185160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16717993 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3298015**

54 Título: **Derivados de pirazolopirimidina**

30 Prioridad:

21.05.2015 GB 201508747

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

25.08.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF EDINBURGH (100.0%)
Old College South Bridge
Edinburgh EH8 9YL, GB**

72 Inventor/es:

**UNCITI-BROCETA, ASIER;
FRASER, CRAIG y
O. CARRAGHER, NEIL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 780 382 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de pirazolopirimidina

La presente invención se refiere a compuestos de pirazolopirimidina que son capaces de inhibir, más preferiblemente, inhibir selectivamente una o más tirosina cinasas. Los compuestos encuentran aplicaciones en el tratamiento de una variedad de trastornos, incluidos trastornos proliferativos como el cáncer, trastornos óseos, neurológicos y virales.

Antecedentes de la invención

La mayoría de los programas de descubrimiento de fármacos comienzan con una campaña de detección (p. ej., bioquímica, virtual o biofísica) para agonistas, antagonistas o inhibidores de un objetivo designado asociado a una enfermedad en particular [1-4]. Después de la identificación del resultado positivo, la optimización química posterior se basa fundamentalmente en la potencia "en el objetivo" [1]. La generación de los llamados compuestos de partida (= ligandos de alta afinidad) es seguida por el refinamiento de la química medicinal en derivados de potencia y/o selectividad superiores, y propiedades farmacocinéticas deseables (= semejanza a fármacos) [1, 5]. Los candidatos a fármacos seleccionados son luego validados *in vivo* y, tras verificar la seguridad y la eficacia, avanzan a ensayos en humanos [5]. Este proceso bien definido, que generalmente consume más de una década de trabajo de investigación y decenas de millones de libras en su camino hacia la clínica, tiene una tasa de éxito particularmente baja en el desarrollo de medicamentos contra el cáncer [6]. Esto se debe a que, además de las enormes dificultades de traducir un programa de descubrimiento de fármacos desde la identificación de objetivos, a través del desarrollo preclínico y clínico, hasta la aprobación reglamentaria y la comercialización, se ha hecho evidente que los enfoques convencionales no se adaptan adecuadamente a las patologías generadas por la acción concomitante o secuencial de múltiples factores etiológicos como el cáncer [6-8]. La alta deserción durante el desarrollo de fármacos en etapas tardías ha subrayado que dilucidar la heterogeneidad del cáncer entre los pacientes y los mecanismos adaptativos de resistencia a los fármacos son los principales obstáculos para el desarrollo de terapias dirigidas eficaces contra el cáncer [9-11]. Estos desafíos estimulan el pensamiento innovador en la investigación farmacoterapéutica (p. ej., polifarmacología dirigida [10], conjugados anticuerpo-fármaco [12], estrategias innovadoras con profármacos [13-17], etc.) y la reexaminación de los principios básicos del descubrimiento de fármacos en oncología [18-20]. El aumento del descubrimiento moderno de fármacos fenotípicos [18, 19] junto con el uso de modelos de cáncer clínicamente relevantes para guiar el desarrollo temprano de fármacos [20], son ejemplos representativos del cambio de paradigma iniciado en el campo para desencadenar un punto de inflexión positivo.

Las proteínas cinasas son componentes integrales de las cascadas de transducción de señales intracelulares. Gobiernan una amplia gama de funciones celulares básicas y coordinan las comunicaciones célula a célula y matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) a célula para influir en la fisiología celular y tisular. De este modo, las cinasas están directamente involucradas en enfermedades progresivas que incluyen el cáncer y la inflamación [21]. Los avances en la comprensión de la biología de las células cancerosas junto con la aprobación de varios inhibidores de cinasas para el tratamiento del cáncer han demostrado la validez de varias cinasas como objetivos contra el cáncer [22], mientras que, por el contrario, se ha demostrado que otras proteínas cinasas tienen una función esencial en las vías supresoras de tumores (antiobjetivos) [23-26].

La gran mayoría de los inhibidores de la cinasa se dirigen a la cavidad de ATP de la cinasa y debido a que todas las cinasas (>500) poseen necesariamente este sitio catalítico relativamente bien conservado, existe un gran potencial de reactividad cruzada [10]. De hecho, incluso si la mayoría de los inhibidores de cinasas clínicamente aprobados se han desarrollado a partir de una única hipótesis objetivo, típicamente muestran un amplio perfil de selectividad que, en algunos casos, ha dado lugar a aplicaciones clínicas no anticipadas (p. ej., sorafenib) [26]. La promiscuidad de un inhibidor también puede ser ventajosa para la terapia anticancerígena cuando las actividades inespecíficas ayudan a abordar los problemas de bioactividad relacionados con la redundancia de la vía, la heterogeneidad molecular o los mecanismos de resistencia [9, 10, 26]. Por el contrario, si estas actividades provocan la inhibición de las vías antioncogénicas o conducen a efectos secundarios graves, la promiscuidad del fármaco se convierte en un gran inconveniente. Paradójicamente, existe una fuerte evidencia que indica que algunas cinasas pueden comportarse como un objetivo o un antiobjetivo, dependiendo del contexto del cáncer. A modo de ilustración, la expresión de la oncoproteína de fusión activada Bcr-Abl es una anomalía genética asociada con la leucemia mieloide crónica (LMC) y los inhibidores de Abl (imatinib, dasatinib) se usan clínicamente en el tratamiento de la fase crónica de la LMC [27]. Además, las cinasas de la familia Abl se activan de manera anormal en varios tumores sólidos, lo que respalda su participación en la oncogénesis [27]. Sin embargo, se ha encontrado que Abl (Abl1) y Arg (Abl2) modulan negativamente la progresión del cáncer de mama *in vivo* [28-30], lo que indica que la inhibición de Abl podría ser contraproducente para su tratamiento (= antiobjetivo de cáncer de mama). Este ejemplo sirve para delinear la complejidad de la etiología del cáncer y resalta la necesidad de desarrollar inhibidores de cinasas con perfiles farmacodinámicos a medida para el direccionamiento eficaz a cada subtipo de cáncer. Desafortunadamente, a pesar de la gran cantidad de inhibidores de moléculas pequeñas y el conocimiento biomédico acumulado a lo largo de los años, la comprensión limitada de la biología del cáncer impide el direccionamiento adecuado a las acciones orquestadas que generan, mantienen y hacen progresar la mayoría de los procesos neoplásicos.

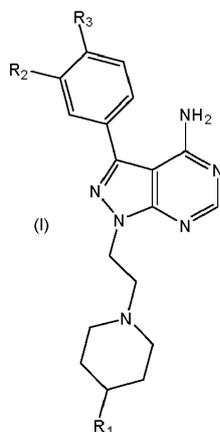
Reconociendo estas limitaciones, muchos grupos de investigación están concentrándose en la búsqueda de datos empíricos sólidos para avanzar en los programas de desarrollo de fármacos contra el cáncer lejos de las hipótesis

clásicas contra el cáncer sin matices. Las publicaciones internacionales WO2013/177668 y WO2002/076986 divulgan derivados de pirazolopirimidina y su uso para el tratamiento del cáncer, trastornos virales y enfermedades neurodegenerativas. La publicación internacional WO2015/018333 describe compuestos para inhibir la actividad de la tirosina cinasa de Bruton.

5 La presente invención busca proporcionar inhibidores de tirosina cinasa que tengan potentes propiedades antiproliferativas. La invención se basa en tres hipótesis: (i) el uso de detección fenotípica en modelos designados de cáncer se puede usar para generar relaciones estructura-bioactividad objetivo-agnósticas y guiar la optimización del ligando adaptada a tipos/subtipos de cáncer particulares; (ii) dirigir a la cavidad de ATP de la cinasa compuestos derivados de inhibidores de cinasa promiscuos puede permitir descubrimientos fortuitos "sesgados racionalmente"; y
 10 (iii) la mejora temprana de la semejanza a fármacos en ligandos promiscuos se puede usar simultáneamente para explorar la diversidad farmacodinámica. Mediante esta estrategia pragmática para el descubrimiento del inhibidor de la cinasa, se facilitó en gran medida la deconvolución objetivo de los resultados positivos y los compuestos de partida identificados, lo que permitió la identificación rápida de los objetivos y antiobjetivos moleculares involucrados en el fenotipo observado.

15 **Declaración de invención**

Un primer aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este,



en donde:

20 R₁ es (CH₂)_mNR₁₁R₁₂;

R₂ se selecciona de H, halo, OR₁₃, NHR₁₃, alquilo, alquenilo y alquinilo;

R₃ se selecciona de alquilo, NHCO₂R₄, NHCONR₅R₆, NHCONH-alquilo, NHCOR₇, NH (CH₂)_n-arilo, (CH₂)_p-heteroarilo y (CH₂)_qCO₂R₈, en donde cada resto alquilo, alquenilo, arilo o heteroarilo en la lista mencionada anteriormente está
 25 opcionalmente sustituido adicionalmente por uno o más grupos seleccionados de alquilo, halo, OH, NH₂, alcoxi, ariloxi, alquilamino, arilamino, carboxilo y carboxamida;

R₄ a R₈ y R₁₃ cada uno se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo y arilo;

R₁₁ y R₁₂ cada uno se selecciona independientemente de alquilo y alquenilo; o R₁₁ y R₁₂ están unidos entre sí con el nitrógeno al que están acoplados para formar un grupo heterocicloalquilo o heterocicloalquenilo;

n, m, p y q se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1 y 2.

30 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto como se describió anteriormente y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un compuesto como se describió anteriormente para su uso en medicina.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un compuesto como se describió anteriormente para su uso en el
 35 tratamiento del cáncer; u osteoporosis; o un trastorno neurológico; o angiogénesis; o enfermedad pulmonar o enfermedad ósea metastásica.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno seleccionado de cáncer, osteoporosis, trastorno neurológico, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, angiogénesis, enfermedad pulmonar y enfermedad ósea metastásica.

Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en un ensayo para identificar compuestos candidatos adicionales capaces de inhibir, o inhibir selectivamente, una tirosina cinasa.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a una combinación que comprende un compuesto como se describió anteriormente y un segundo agente terapéutico.

- 5 Un décimo aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar compuestos como se describen en el presente documento.

Descripción detallada

- 10 La presente invención se refiere a compuestos de pirazolopirimidina que son capaces de inhibir, o más preferiblemente inhibir selectivamente, una o más cinasas, preferiblemente una o más tirosina cinasas, incluso más preferiblemente, Src-cinasa. En particular, la invención se refiere a compuestos de pirazolopirimidina sustituidos que tienen un patrón de sustitución específico.

"Alquilo" se define en el presente documento como un radical alquilo de cadena lineal o ramificada, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo. Preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₁₂, más preferiblemente, un grupo alquilo C₁₋₆, incluso más preferiblemente, un grupo alquilo C₁₋₄.

- 15 "Alquenilo" se define en el presente documento como un radical de cadena lineal o ramificada, que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Preferiblemente, el grupo alquenilo es un grupo alquilo C₂₋₁₂, más preferiblemente, un grupo alquilo C₂₋₆, incluso más preferiblemente, un grupo alquilo C₂₋₄. "Alquinilo" se define en el presente documento como un radical de cadena lineal o ramificada, que contiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. Preferiblemente, el grupo alquinilo es un grupo alquilo C₂₋₁₂, más preferiblemente, un grupo alquilo C₂₋₆,
20 incluso más preferiblemente, un grupo alquilo C₂₋₄.

"Cicloalquilo" se define en el presente documento como un anillo de alquilo monocíclico tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo, o un sistema de anillo bicíclico fusionado tal como norbornano. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es un grupo cicloalquilo C₃₋₈, más preferiblemente, un grupo cicloalquilo C₃₋₆.

- 25 "Cicloalquenilo" se define en el presente documento como un grupo cíclico como se definió anteriormente para cicloalquilo, pero que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Preferiblemente, el grupo cicloalquenilo es un grupo cicloalquenilo C₃₋₈, más preferiblemente, un grupo cicloalquenilo C₃₋₆.

"Halógeno" se define en el presente documento como cloro, flúor, bromo o yodo.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático C₆₋₁₂, que puede estar benzocondensado, por ejemplo, fenilo o naftilo.

- 30 "Heteroarilo" se define en el presente documento como un anillo aromático C₂₋₁₂ monocíclico o bicíclico que comprende uno o más heteroátomos (que pueden ser iguales o diferentes), como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo adecuados incluyen tienilo, furanilo, pirrolilo, piridinilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, etc. y derivados benzo de estos, tales como benzofuranilo, benzotienilo, benzimidazolilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, etc. o piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo, etc. y derivados benzo de estos, tales como quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, etc.

n, m, p y q se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1 y 2.

En una realización preferida, R₁₁ y R₁₂ son alquilo.

En una realización preferida, m es 0.

- 40 En otra realización preferida, m es 1.

En otra realización preferida, R₁₁ y R₁₂ están unidos entre sí con el nitrógeno al que están acoplados para formar un grupo heterocicloalquilo. Preferiblemente, para esta realización, m es 0.

Preferiblemente, R₁₁ y R₁₂ están unidos entre sí con el nitrógeno al que están acoplados para formar un grupo heterocicloalquilo de 6 miembros o un grupo heterocicloalquilo de 5 miembros.

- 45 En una realización más preferida, R₁ se selecciona de NMe₂, CH₂NMe₂, pirrolidin-1-ilo y piperidin-1-ilo.

En una realización preferida, R₂ se selecciona de H y alcoxi, más preferiblemente, H y OMe.

En una realización preferida, R₃ se selecciona de alquilo, NHCO₂R₄, NHCOR₇, NH(CH₂)_n-arilo, NHCONR₅R₆, (CH₂)_p-heteroarilo y (CH₂)_qCO₂R₈.

En una realización preferida, R₄ a R₁₀ son cada uno independientemente alquilo.

En una realización preferida, R₃ se selecciona de Me, NHCO₂-alquilo, NHCO-alquilo, NH (CH₂)_n-arilo, NHCONH-alquilo, (CH₂)_p-heteroarilo y (CH₂)_qCO₂-alquilo.

En una realización preferida, cada uno de n, p y q es 1.

5 En una realización preferida, R₃ se selecciona de Me, NHCO₂-^tBu, NHCOCH₂C(Me)₃, NHCH₂fenilo, NHCONH-^tBu, CH₂-(4-metil-oxazol-2-ilo) y CH₂CO₂-^tBu.

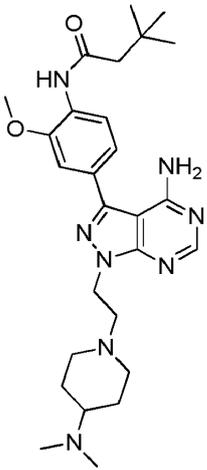
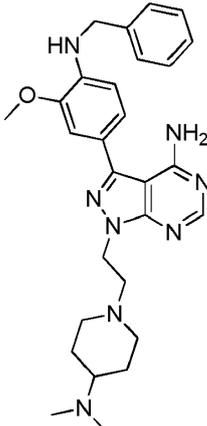
En una realización preferida, R₃ se selecciona de Me y NHCO₂-^tBu.

En una realización preferida, R₃ es Me y R₂ es H.

En una realización preferida, R₂ es alcoxi y R₃ se selecciona de NHCO₂R₄, NHCOR₇, NH(CH₂)_n-arilo, NHCONR₅R₆, (CH₂)_p-heteroarilo y (CH₂)_qCO₂R₈.

10 En una realización preferida, R₂ es OMe y R₃ se selecciona de NHCO₂-^tBu, NHCOCH₂C(Me)₃, NHCH₂fenilo, NHCONH-^tBu, CH₂-(4-metil-oxazol-2-ilo) y CH₂CO₂-^tBu.

En una realización altamente preferida de la invención, el compuesto de fórmula I se selecciona de lo siguiente:

Núm. de compuesto:	Estructura	Núm. de compuesto:	Estructura
		526	
		533	

Núm. de compuesto:	Estructura	Núm. de compuesto:	Estructura
		540	<chem>CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)NCCN(C)C2</chem>
503	<chem>CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)NCCN(C)C2</chem>	543	<chem>CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)NCCN(C)C2</chem>
506	<chem>CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)NCCN(C)C2</chem>	553	<chem>CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc(cc1)c2nc3c(ncn3)NCCN(C)C2</chem>

Núm. de compuesto:	Estructura	Núm. de compuesto:	Estructura
518		565	
519		584	

y sales farmacéuticamente aceptables de estos.

En una realización altamente preferida, el compuesto se selecciona de los compuestos 506, 518, 519, 533, 553 y 565.

En otra realización altamente preferida, el compuesto se selecciona de los compuestos 506 y 565.

5 Diseño, síntesis y selección de nuevas pirazolopirimidinas.

En la búsqueda de inhibidores que potencialmente podrían dirigirse a una amplia gama de cinasas con relevancia en el cáncer, se realizó un programa de desarrollo de fármacos basado en ligandos usando el inhibidor multicinasas PP1 como estructura central (Figura 1). PP1 se dirige indiscriminadamente a las proteínas tirosina cinasas, muchas de las cuales están involucradas en la oncogénesis, como las cinasas de la familia Src (SFK), Ret, Kit y Abl [31-34]. Además, los derivados relacionados desarrollados a partir de entonces [35, 36] han demostrado una fuerte inhibición contra otros grupos de cinasas con relevancia en el cáncer, incluidas VEGFR, PDGFR, PI3K y mTOR. Según la estructura cocrystalina de PP1 con cinasas Hck [37] y Ret [38], esta molécula pequeña es un inhibidor de cinasa tipo I arquetípico [39, 40], con sus grupos N5 y 4-NH₂ que forman múltiples enlaces de hidrógeno con la región bisagra del sitio catalítico de la cinasa [39-41]. El grupo p-tolilo C3 está ubicado en una región hidrófoba bien conservada en la mayoría de las tirosina cinasas, por lo que es responsable de la selectividad parcial del inhibidor con respecto a otras familias de cinasas. Si bien la potente inhibición de PP1 de las cinasas asociadas a la enfermedad (p. ej., SFK, Ret, etc.) lo convierte en una herramienta valiosa para estudios biológicos, su uso clínico está limitado por una muy baja solubilidad en agua y baja selectividad, factores limitantes principales para la traducción clínica de muchos candidatos a fármacos [42].

La sustitución del grupo terc-butilo de PP1 en la posición N1 con grupos solubilizantes para agua flexibles se puede usar tanto para mejorar sus propiedades semejantes a los fármacos como para explorar las regiones accesibles de azúcar/fosfato ocupadas por el ligando natural ATP (Figura 1) en la búsqueda de nuevos perfiles de afinidad de unión. Como se muestra en el panel inferior de la Figura 1, los compuestos se diseñaron para mostrar una amina terciaria

cíclica conectada a la posición *N1* del anillo de pirazolopirimidina a través de un conector de etileno (ver síntesis general en la Figura 2). Después de este procedimiento sintético, la diversidad estructural se implementó fácilmente mediante el acoplamiento de una selección de aminas secundarias cíclicas al derivado de aldehído correspondiente mediante aminación reductora.

5 Varias investigaciones han informado que la sustitución del grupo *p*-tolilo en la posición C3 de PP1 por restos arilo sustituidos (incluso los estrechamente relacionados) tiene un impacto significativo en la unión proteína-ligando. Las campañas de química médica en esa posición han generado inhibidores para una amplia gama de cinasas, incluidas las tirosina cinasas receptoras y no receptoras (p. ej., C-Src, Ret, PDGFR, VEGFR, c-Kit y Abl) [31-35] y no tirosina cinasas (por ejemplo, PI3K y mTOR) [36, 43]. Para expandir el posible alcance farmacodinámico de los nuevos
10 compuestos, junto con las modificaciones implementadas en la posición N3, se empleó una amplia selección de ácidos arilborónicos para funcionalizar la posición C3 del anillo de pirazolopirimidina mediante química de acoplamiento cruzado catalizada por paladio.

La línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7 se seleccionó como un modelo basado en células y se usó una detección fenotípica para evaluar los nuevos compuestos y clasificar los resultados positivos con respecto a
15 diferentes actividades antioncogénicas. Los ensayos basados en células altamente discriminantes no solo permiten la identificación de compuestos que se dirigen a las proteínas involucradas en el crecimiento celular, la migración y la supervivencia de MCF7, sino que también excluyen los productos químicos con baja penetrabilidad celular (y, por lo tanto, semejanza a fármacos deficiente). Buscando propiedades antiproliferativas como hallazgo primario, se calcularon los valores de CE₅₀ en las células MCF7 para los nuevos compuestos usando un estudio de respuesta a la
20 dosis semilogarítmica de 10 puntos (100 μ M a 0,01 μ M). La viabilidad celular se determinó el día 5 usando reactivo PrestoBlue®. Los análisis de espectrofluorometría se llevaron a cabo en un lector de placas Envision®.

Entre todas las estructuras sintetizadas y probadas (ver las Tablas de actividades 1 y 2), la introducción de un 4-(*N*-Boc-amino)-3-metoxifenilo en la posición C3 fue una de las más exitosas (Figura 3a). Por otro lado, se determinó que la presencia de grupos piperidinilo que contienen dimetilamino en la posición N1 es óptima para la potencia
25 antiproliferativa de los compuestos, siendo el grupo dimetilamino-piperidiniletilo el mejor resto encontrado. Las propiedades antiproliferativas de los compuestos 503 y 506 se probaron en células usando dasatinib como control positivo. El Dasatinib es un potente inhibidor de Abl y Src, actualmente se usa en el tratamiento de la LMC en fase crónica y se encuentra en varios ensayos clínicos para diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. Junto con las células MCF7, las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 se sometieron a prueba para
30 explorar la potencia antiproliferativa de los compuestos con respecto a diferentes subtipos de cáncer de mama. Como se muestra en la Figura 3b, el compuesto 506 mostró un efecto antiproliferativo superior al compuesto 503 en las células de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231. Sorprendentemente, el compuesto 506 también superó al dasatinib inhibidor de Src estándar referencial en ambas líneas celulares.

Para identificar el/los objetivo/s que podrían ser responsables del fenotipo inducido por el compuesto de partida 506
35 en células MCF7, se determinaron los valores de CI₅₀ con respecto a una selección de proteínas cinasas humanas implicadas en el cáncer. Las proteínas recombinantes del ensayo se eligieron según el perfil de cinasas de pirazolopirimidinas relacionadas que se encuentran en la literatura [31-36]. Como se muestra en la Tabla 3 (tenga en cuenta que los valores se expresan en nM), ambos compuestos 503 y 506 poseían potencia sub-nano molar contra Src y Yes (protooncogenes que tienen una función esencial en las vías de transducción de señales involucradas en el
40 crecimiento, angiogénesis, invasión y diseminación tumoral) [30] con el compuesto 506 que tiene una selectividad mejorada con respecto a Abl (>950 veces la diferencia en potencia). Farmacológicamente hablando, esto es muy notable ya que la evidencia en la literatura sugiere fuertemente que la inhibición de Abl podría ser contraproducente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de mama [28-30] y la inhibición de Abl también se ha asociado con cardiotoxicidad [44]. Es importante destacar que este perfil de selectividad único diferencia los compuestos de la
45 invención del compuesto PP20 (Figura 3a) [35], que es un inhibidor de la cinasa Abl/Src inespecífico conocido que muestra potencia subnanomolar tanto para Abl como para Src. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la introducción del resto de poliamina en la posición N1 de las pirazolopirimidinas tiene una función en el perfil de selectividad sin precedentes de estos derivados.

Para evaluar adicionalmente el perfil de selectividad mostrado por los compuestos 506 y 503 en un modelo celular no
50 canceroso, se realizaron estudios de respuesta a la dosis en fibroblastos SYF murinos (células deficientes para Src, Yes y Fyn) con el compuesto 506, 503 y dasatinib. La viabilidad celular se determinó en el día 5 usando reactivo PrestoBlue® y se analizó por espectrofluorometría (Figura 3c). Sorprendentemente, los compuestos 506 y 503 mostraron una actividad antiproliferativa mucho menor que el dasatinib en las células SYF, lo que indica que los nuevos
55 compuestos son más selectivos que el dasatinib y podrían conducir a un efecto secundario reducido causado por actividades inespecíficas.

Las modificaciones del compuesto 506 condujeron a una serie de derivados con propiedades similares (Tabla 1) y muchos compuestos con baja selectividad y/o actividad antiproliferativa (Tabla 2).

Inhibidores de cinasa Src altamente selectivos

Src es una tirosina cinasa no receptora y el miembro más estudiado de las cinasas de la familia Src (SFK), que incluyen

Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Frk y Yes. La expresión y/o actividad aumentada de Src se ha informado en muchos tipos de tumores, pero se describe mejor en el cáncer de colon y de mama donde la actividad de Src se correlaciona con el potencial de malignidad y el mal pronóstico clínico [47, 49].

La resistencia farmacológica adquirida a numerosos agentes anticancerígenos, incluidos cetuximab, oxaliplatino, gemcitabina, rapamicina, taxanos e inhibidores de B-RAF, se ha asociado con la señalización desregulada de Src [65, 57, 54, 48, 56, 50]. Estos estudios indican que la actividad de Src representa un mecanismo común de resistencia a fármacos y la inhibición dirigida de Src puede sensibilizar a los tumores resistentes a una serie de intervenciones terapéuticas o proporcionar una opción de tratamiento alternativa en la enfermedad recurrente en etapa avanzada. Por ejemplo, la actividad de Src también se ha identificado como un mecanismo de señalización común en la resistencia al trastuzumab, lo que indica que los inhibidores de Src pueden proporcionar un tratamiento alternativo para los tumores de mama resistentes al trastuzumab [66].

El fuerte vínculo con la enfermedad y la correlación entre la actividad de Src con un mal pronóstico del cáncer, la morbilidad y la resistencia adquirida a la terapia existente respaldan la premisa de que Src representa un objetivo terapéutico importante contra el cáncer. Varios inhibidores de Src (Dasatanib, Bosutinib, Saracatinib, AZD0424) han ingresado a la clínica y se están realizando varios ensayos de Fase I/II para distintas indicaciones de cáncer [58, 49]. Sin embargo, los datos de resultados clínicos publicados hasta la fecha no han sido convincentes y el desafío no resuelto es identificar qué pacientes tienen más probabilidades de beneficiarse de la inhibición dirigida de Src y cuáles son los entornos clínicos más apropiados para demostrar eficacia, p. ej., criterios de valoración avanzados de la enfermedad o combinación con agentes existentes o terapias combinadas novedosas diseñadas racionalmente.

Todos los inhibidores de la cinasa Src actuales (Dasatanib, Bosutinib, Saracatinib, AZD0424) representan inhibidores no selectivos de la tirosina cinasa con actividades inespecíficas significativas que contribuyen a eventos adversos y toxicidades limitantes de la dosis. Todos los inhibidores de Src existentes también demuestran actividad potente contra Abl1 (homólogo 1 de oncogén viral de leucemia murina de Abelson), una proteína tirosina cinasa citoplasmática y nuclear. La translocación t(9;22) da como resultado la fusión de la cabeza a la cola de los genes BCR y ABL1, lo que lleva a un gen de fusión constitutivamente activo presente en muchos casos de leucemia mielógena crónica, que se tratan con éxito con inhibidores de BCR-Abl1.

Las actividades inespecíficas de los inhibidores de Src conocidos no fueron seleccionadas ni optimizadas mediante un diseño racional y pueden limitar su uso en situaciones avanzadas de enfermedad del cáncer como terapia combinada, donde la actividad inespecífica innecesaria contribuye a la toxicidad limitante de la dosis y limitante de la combinación. Existe evidencia que indica que el direccionamiento terapéutico de Abl puede tener efectos perjudiciales sobre la cardiotoxicidad [51, 56] y el tejido no tumoral a través de su doble función como supresor tumoral, contribuyendo potencialmente a la neoplasia [64, 62, 45, 55]. Además, la evidencia sugiere que el direccionamiento a Abl contribuye a la osteopenia [60]. Por lo tanto, los inhibidores dobles de Src/Abl no selectivos actuales no son apropiados para la aplicación a largo plazo tanto en indicaciones cancerosas como no cancerosas (p. ej., osteoporosis o infección por virus).

Se empleó una estrategia de detección fenotípica para identificar y optimizar inhibidores de c-Src cinasa novedosos y altamente potentes con perfiles de selectividad para objetivos mejorados en comparación con los inhibidores de Src existentes en el mercado. La estrategia de detección fenotípica favorece el descubrimiento de moléculas pequeñas con propiedades biofísicas óptimas. Usando este método, se encontraron pirazolopirimidinas con potentes actividades antiproliferativas. Inesperadamente, después de la identificación del objetivo, se demostró que los compuestos actualmente reivindicados (incluidos, p. ej., los compuestos 506, 518, 519, 533, 553 y 565) son los únicos inhibidores de c-Src cinasa altamente potentes descritos hasta la fecha que no se dirigen a Abl, pero ejercen propiedades antiproliferativas, antimigratorias y citotóxicas sobre las células cancerosas *in vitro* con potencia comparable a los inhibidores de Src no selectivos existentes (Tablas 4 y 5).

En resumen, todos los inhibidores de la cinasa Src actualmente en desarrollo clínico no se adaptan adecuadamente al uso óptimo de un inhibidor de Src como terapia de combinación de fármacos en situaciones de enfermedad avanzada o en el tratamiento crónico de indicaciones de enfermedad no cancerosa como resultado de una actividad inespecífica significativa, incluida la inhibición adversa de Abl1. Los compuestos reivindicados actualmente son los primeros inhibidores selectivos de la cinasa Src descritos que no inhiben Abl1. Por ejemplo, los compuestos 506 y 565, que son altamente preferidos, son superiores a los inhibidores de Src existentes para su uso en la situación de enfermedad del cáncer avanzada como terapia combinada.

Como se muestra en la Tabla 5 y la Figura 4, los nuevos inhibidores de Src son específicos para las cinasas de la "familia Src" con respecto a otros miembros de la familia más amplia de cinomas. La familia Src se compone de varios homólogos estrechamente relacionados (p. ej., Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Frk y Yes). Los homólogos están altamente conservados y sería extremadamente difícil seleccionar selectivamente a miembros distintos de la familia mediante moléculas pequeñas. A diferencia de todos los inhibidores de Src publicados hasta la fecha, y en la clínica, los compuestos actualmente reivindicados son las únicas moléculas que se dirigen específicamente a los miembros de la familia Src con potencia baja/subnanomolar y no a otras cinasas, incluida Abl. Los datos completos de detección del panel de cinomas para el compuesto 506 respaldan esta afirmación (ver Figura 4).

El análisis de las propiedades de solubilidad encontró que los compuestos reivindicados actualmente poseen buena solubilidad en PBS (>100 mg/ml). Además, muestran una buena estabilidad en presencia de microsomas hepáticos y unión a plasma en un nivel de 81-91% (ver Tabla 6).

5 Se estudió la inhibición del canal hERG para compuestos seleccionados de la invención. Se usó un kit basado en fluorescencia de Life Technologies (kit de ensayo de polarización de fluorescencia de hERG Predictor®). Todos los compuestos mostraron $CI_{50} > 10 \mu M$. El más potente de la serie fue el compuesto 533 con CI_{50} (10-15 μM). También se realizó un segundo ensayo de seguridad con hERG que usa cribado de electrofisiología de alto rendimiento Ionworks™ para compuestos seleccionados de la invención, junto con análisis de estabilidad plasmática (ratón, rata y humano). Los resultados se muestran en la Tabla 7. Estos experimentos corroboraron la seguridad de los compuestos. 10 Los estudios de estabilidad en plasma demuestran la alta estabilidad de los compuestos en plasma humano.

Posteriormente, se estudiaron la PK *in vivo* (iv y po) en ratones hembra para los compuestos 506 y 565. Se estudiaron los niveles en sangre y plasma durante 8 horas y los compuestos no mostraron efectos tóxicos. La administración oral demostró que los compuestos están disponibles por vía oral. Mientras que 506 mostró una biodisponibilidad oral moderada, 565 mostró una excelente biodisponibilidad oral (52 %). La semivida del compuesto 506 fue superior a la del compuesto 565. 15

Como se observa en la Tabla 8, se demostró que la inhibición de CYP P450 es residual. Dada la potencia de los compuestos, cualquier inhibición inferior al 50 % a concentraciones superiores a 10 μM no se considera significativa.

Se realizaron estudios de PD *in vitro* con células MDA-MB-231, que mostraron una fuerte inhibición de fosfo-Src a baja concentración de nanoM (ver Figura 5 a continuación).

20 Para probar si la inhibición de Abl podría influir en el efecto fenotípico mediado por los compuestos, se realizaron estudios de combinación con el compuesto 506 y el inhibidor alostérico específico de Abl GNF-2. Como se muestra en la Figura 6, la titulación del inhibidor de Abl antagoniza la actividad del compuesto sobre la viabilidad de las células cancerosas *in vitro*. Se observa una falta de eficacia clínica con los inhibidores de Src existentes cuando se usan como monoterapia en el cáncer, por lo que durante algún tiempo se ha argumentado que los inhibidores de Src deben usarse en terapia combinada. Se cree que la ausencia de actividad perjudicial inespecífica, incluida la actividad de Abl (exclusiva de los compuestos reivindicados actualmente) mejorará tanto la eficacia como minimizará los eventos adversos resultantes de la actividad inespecífica. 25

Las cinasas de la familia Src son bien conocidas por tener un papel activo en la migración e invasión celular y son metástasis involucradas en pacientes con cáncer [67, 68]. Para probar si el compuesto 506 podría inhibir la migración celular *in vitro* se estableció un ensayo de herida por rasguño usando el sistema Incucyte Zoom. Se tomaron imágenes de las células en intervalos de 30 minutos durante 24 horas. 30

La migración de células MDA-MB-231 se inhibió tan pronto como 6 horas en el estudio y la potencia se retuvo hasta el final del ensayo, 24 horas (ver Figura 7). El compuesto 506 mostró resultados comparables a Dasatinib.

35 Como estudio de toxicidad y estudio fenotípico *in vivo*, se realizó un ensayo de regeneración de la cola de pez cebra [69]. Como lo demuestran Yoo y sus colegas [69], la acción de las cinasas de la familia Src (en particular Fynb, similar a la Fyn humana) es necesaria para la regeneración de las aletas amputadas. Esto se usó para evaluar y comparar la actividad *in vivo* del compuesto 506 y Dasatinib. Como se muestra en la Figura 8, el compuesto 506 y dasatinib inhibieron la regeneración de la aleta caudal. Sin embargo, el compuesto 506 no mostró ningún otro efecto fenotípico no tóxico sobre el embrión, mientras que Dasatinib indujo claramente cardiotoxicidad (un efecto secundario limitante de la dosis bien establecido de los inhibidores de Abl, incluido Dasatinib). 40

Detección fenotípica del inhibidor de SRC 506 en pez cebra

El desarrollo del pez cebra proporciona un ensayo fenotípico rápido para evaluar simultáneamente la seguridad y la eficacia de nuevos compuestos en un vertebrado vivo [78]. Las detecciones basadas en fenotipos de molécula pequeña en el pez cebra han implicado recientemente a la cinasa SRC en la migración de la línea lateral posterior del primordio [79], un grupo cohesivo de células que migra horizontalmente debajo de la piel a lo largo del miosepto hasta el final de la cola, depositando periódicamente neuromastos. Para determinar los efectos de 506 en la migración celular *in vivo*, tratamos pez cebra transgénico *Tg (brn3c: mGFP)* [80] que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en las células ciliadas mecanosensoriales de la línea lateral (que forman parte de los neuromastos) con 506 y dasatinib durante 2d y medimos la distancia del último neuromasto a la punta de la cola (marcado por el final de la notocorda y la presencia de melanocitos negros, Fig. 9a, línea discontinua vertical). 506 redujo significativamente la migración de neuroblastos (>100 micras en promedio) con un efecto mínimo sobre el desarrollo de los embriones (Fig. 9a-c). En cambio, el tratamiento con dasatinib con >10 μM resultó en cardiotoxicidad fuerte y muerte de la mayoría de los embriones. A concentraciones que eran compatibles con la supervivencia del embrión (1-10 μM), dasatinib no inhibió la migración de neuroblastos, mientras que todavía indujo un fenotipo cardiotoxico patente (observe el agrandamiento del corazón en la Fig. 9c). Otros estudios de seguridad mostraron que el inhibidor dual de ABL/SRC PP20 también induce una cardiotoxicidad grave en el pez cebra, incluso después de un tratamiento corto. Estos resultados, que se correlacionan con la función esencial de ABL en el desarrollo y la curación del corazón [81], [82], sugieren que la selectividad de 506 con respecto a ABL podría ser ventajosa para la terapia cuando no se requiere la inhibición de ABL. 55

Estudio de inhibición de SRC *in vivo* en un modelo de xenoinjerto tumoral

Se confirmó por transferencia Western la presencia de SRC activo (fosforilado) en células de cáncer colorrectal humano HCT116 y su inhibición con tratamiento con 506. Posteriormente, se realizó un estudio de PD *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de células HCT116 en ratones [83]. Se inyectaron células HCT116 por vía subcutánea y se permitió que los tumores crecieran hasta 3-4 mm de diámetro. Posteriormente, los ratones fueron dosificados diariamente durante 3 días con 506 (50 mg/kg, en agua nanopura) o vehículo (agua nanopura) por sonda oral y se sacrificaron 3 h después de la última dosis (n = 4). Los tumores se extirparon, fijaron y se etiquetaron las secciones para fosfo-SRC^{Y416} y se tiñeron con hematoxilina. Como se muestra en la Figura 10, el análisis de microscopía demostró una reducción significativa de fosfo-SRC^{Y416} en las secciones de xenoinjerto de ratones tratados con 506 en relación con los controles de animales no tratados.

Aplicaciones terapéuticas

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto como se describió anteriormente para su uso en medicina.

Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de un trastorno proliferativo, trastornos neurológicos y osteoporosis.

En una realización preferida, el trastorno proliferativo es el cáncer. Preferiblemente, el cáncer se selecciona de cánceres sólidos en cualquier etapa. Preferiblemente, el cáncer está en una etapa avanzada, con lesiones metastásicas.

Preferiblemente, el cáncer primario se selecciona de cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma de próstata, cáncer de vejiga, pancreático, de vías respiratorias y digestivas altas y ovario, con o sin metástasis, y cánceres hematológicos como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (LLA), mieloma múltiple (MM) y linfoma no hodgkiniano.

Las indicaciones de enfermedad de cáncer primario particularmente preferidas incluyen, pero no se limitan a: cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama positivo para Her2 resistente a Trastuzumab y/o Lapatinib, melanoma avanzado que incluye enfermedad resistente a Vemurafenib y mieloma múltiple.

En una realización preferida, el trastorno proliferativo es la linfangioleiomiomatosis (LAM), una enfermedad pulmonar progresiva en la que las células atípicas, que se originan en algún lugar del cuerpo, se propagan a través de los pulmones, bloqueando gradualmente las pequeñas vías respiratorias y produciendo quistes. Típicamente, la enfermedad progresa lentamente, pero eventualmente puede restringir la respiración hasta causar la muerte. Actualmente no existe una cura probada para LAM. La cinasa Src es activa en las células de LAM y es importante para el crecimiento celular y la capacidad de las células para moverse e invadir el tejido pulmonar [70]. Los ensayos clínicos para investigar la tolerabilidad de saracatinib en pacientes con Lam están actualmente en curso.

El trastorno proliferativo podría ser la aterosclerosis y la restenosis caracterizadas por la migración y la hiperproliferación de las células vasculares del músculo liso. La señalización de la cinasa Src se ha implicado previamente en la proliferación de células del músculo liso aórtico inducida por factores de riesgo clínicos detectados en la circulación; Péptido C y LDL glicosilada [71, 72].

Los compuestos descritos en el presente documento también son adecuados para la administración crónica en varias indicaciones de enfermedades no cancerosas, como la osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer.

En una realización preferida, el trastorno es osteoporosis o metástasis ósea. La actividad de Src está implicada en la enfermedad ósea metastásica, que representa el sitio metastásico primario para pacientes con cáncer de mama. La integridad estructural y las funciones normales del hueso se rigen por el equilibrio cuidadosamente controlado de la resorción ósea mediada por osteoclastos y la producción ósea mediada por osteoblastos. La actividad de Src tiene una función clave tanto en la función osteoclástica como en la colonización tumoral del hueso [61]. Por lo tanto, la inhibición dirigida de la actividad de Src puede inducir la formación de hueso neto [46] y aliviar la morbilidad significativa asociada con la enfermedad ósea metastásica y potencialmente la osteoporosis.

El compuesto también podría ser útil en el tratamiento de trastornos virales, preferiblemente el virus de Epstein Barr. El virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), también llamado virus del herpes humano 4 (HHV-4), es uno de los ocho virus de la familia del herpes, y es uno de los virus más comunes en humanos. Se conoce mejor como la causa de la mononucleosis infecciosa (fiebre glandular). También se asocia con formas particulares de cáncer, como el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y las afecciones asociadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como la leucoplasia pilosa y los linfomas del sistema nervioso central. Existe evidencia de que la infección con EBV está asociada con un mayor riesgo de ciertas enfermedades autoinmunitarias, especialmente dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y esclerosis múltiple. Se cree que unos 200.000 casos de cáncer por año son atribuibles al EBV. El EBV infecta los linfocitos B del sistema inmunitario y las células epiteliales. Una vez que la infección lítica inicial del EBV se controla, el EBV persiste latentemente en los linfocitos B del individuo por el resto de la vida del individuo.

El trastorno viral podría ser la infección por el virus del dengue. Los casos de fiebre del dengue han aumentado drásticamente en las últimas 4 décadas con entre 50 y 528 millones de personas infectadas anualmente. Los síntomas incluyen fiebre alta repentina, dolores de cabeza intensos, dolor detrás de los ojos, dolor intenso en las articulaciones y los músculos, náuseas, vómitos, erupción cutánea, sangrado leve (como sangrado de la nariz, sangrado de las encías o moretones fáciles). Aproximadamente, el 5 % de las personas sufren síntomas más graves y potencialmente mortales (p. ej., síndrome de shock por dengue y fiebre hemorrágica del dengue). La fiebre del dengue está directamente relacionada con la infección por el virus del dengue, un virus de ARN de cadena positiva y transmitido por mosquitos. El desarrollo de una vacuna contra la enfermedad está compuesto por cinco serotipos distintos del virus del dengue que pueden causar la enfermedad, por lo tanto, cualquier vacuna debe inmunizar contra los cinco tipos para ser efectiva. Hasta la fecha no se han desarrollado vacunas ni tratamientos curativos. Un estudio reciente publicado en el Journal of Virology identificó al miembro de la familia Src, la cinasa Fyn, como un importante objetivo de la célula huésped requerido para la replicación del ARN del virus del dengue en las células [53]. El tratamiento de las células infectadas con el virus del dengue con inhibidores de Src de molécula pequeña, AZD0530 y Dasatinib inhibió la replicación viral, sin embargo, el paso en serie del virus del dengue en presencia de Dasatinib condujo a la identificación de una mutación en el dominio transmembrana 3 de la proteína NS4B que supera la inhibición de la replicación de ARN por AZD0530 y Dasatinib. Por lo tanto, al igual que las células cancerosas, los virus pueden adquirir rápidamente resistencia a la terapia dirigida y, por lo tanto, las terapias combinadas representan el estándar de atención. A diferencia de otros inhibidores de Src, la selectividad del compuesto 518 está estrictamente restringida a los miembros de la familia Src del cinoma, incluida Fyn (Tabla 5) y, por lo tanto, puede representar un componente ideal de la terapia combinada para la fiebre del dengue u otras infecciones de virus donde los miembros de la familia Src están implicados, p. ej, virus de Epstein Barr y VIH1 [63, 59]. El trastorno viral podría ser VIH1.

En una realización preferida, el trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer. Estudios recientes han demostrado la participación de Fyn, un miembro de la familia Src, en las vías de señalización que conducen a patologías cerebrales graves, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson [73, 74]. Fyn desempeña una función en la regulación de la producción de placas de amiloide- β ($A\beta$) y media los déficits sinápticos inducidos por $A\beta$ y la neurotoxicidad. Fyn también induce la fosforilación de la tirosina de tau [75]. Recientemente se completó un estudio de fase Ib de saracatinib (AZD0530), un inhibidor de molécula pequeña con alta potencia para Src y Fyn, para el tratamiento de la EA, con resultados alentadores que respaldan un ensayo clínico en fase IIa en curso. En particular, con la dosis más alta usada, uno de los sujetos tratados con Saracatinib desarrolló insuficiencia cardíaca congestiva, que estaba relacionada con el tratamiento [76]. Este efecto adverso limitante de la dosis subraya la importancia de los inhibidores de la familia Src altamente específicos en el tratamiento de diferentes enfermedades.

Otro aspecto se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno seleccionado de osteoporosis, un trastorno neurológico, un trastorno proliferativo y un trastorno viral.

Otro aspecto se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer.

Preferiblemente, el compuesto se administra en una cantidad suficiente para inhibir una o más tirosina cinasas. Más preferiblemente, la tirosina cinasa es una cinasa de la familia Src. Como se usa en el presente documento, el término "cinasa Src" se refiere a un miembro de la familia Src de tirosina cinasas no receptoras.

Otro aspecto se refiere a un compuesto de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno causado, asociado o acompañado por cualquier actividad anormal contra un objetivo biológico, en donde el objetivo es una tirosina cinasa, más preferiblemente una cinasa de la familia Src.

Otro aspecto más se refiere al uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un trastorno causado, asociado o acompañado por cualquier actividad anormal contra un objetivo biológico, en donde el objetivo es una tirosina cinasa, más preferiblemente una cinasa de la familia Src.

El término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada que incluyen, pero no se limitan a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos. por practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

El término "administrar", como se usa en el presente documento, se refiere a un método para unir un compuesto de la presente invención y una proteína cinasa de tal manera que el compuesto pueda afectar directamente a la actividad enzimática de la proteína cinasa; es decir, al interactuar con la proteína cinasa misma o indirectamente; es decir, al interactuar con otra molécula de la que depende la actividad catalítica de la proteína cinasa. Como se usa en el presente documento, la administración se puede lograr ya sea *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, o *in vivo*, es decir, en células o tejidos de un organismo vivo.

En el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir, ralentizar o revertir sustancialmente la progresión de una enfermedad o trastorno, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno.

En el presente documento, el término "prevenir" se refiere a un método para impedir que un organismo adquiera un trastorno o enfermedad en primer lugar.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando.

- 5 Para cualquier compuesto usado en esta invención, una cantidad terapéuticamente eficaz, también denominada en el presente documento como una dosis terapéuticamente eficaz, puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la CI_{50} o la CI_{100} según lo determinado en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Las dosis iniciales también se pueden
10 estimar a partir de datos *in vivo*. Usando estas pautas iniciales un experto en la técnica podría determinar una dosis eficaz en humanos.

- Además, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., determinando la DL_{50} y la DE_{50} . La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico y
15 puede expresarse como la relación entre DL_{50} y DE_{50} . Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación
20 empleada y la vía de administración usada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente. (ver, p. ej., Fingl *et al*, 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, capítulo 1, página 1).

- La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del compuesto activo que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosis habituales del paciente para la
25 administración oral varían de aproximadamente 50-2000 mg/kg/día, comúnmente de aproximadamente 100-1000 mg/kg/día, preferiblemente, de aproximadamente 150-700 mg/kg/día y, lo más preferiblemente, de aproximadamente 250-500 mg/kg/día. Preferiblemente, se alcanzarán niveles séricos terapéuticamente eficaces administrando múltiples dosis cada día. En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la técnica podrá optimizar las dosis locales
30 terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

- Como se usa en el presente documento, "enfermedad o trastorno relacionado con la tirosina cinasa" se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por una actividad o sobreactividad inapropiada de la cinasa. Por actividad inapropiada se entiende cualquiera de; (i) expresión de la cinasa en células que normalmente no expresan dicha cinasa; (ii) aumento de la expresión de la cinasa que conduce a la proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular
35 no deseado; o (iii) disminución de la expresión de la cinasa que conduce a reducciones no deseadas en la proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular. La sobreactividad de la cinasa se refiere a la amplificación del gen que codifica una cinasa particular o la producción de un nivel de actividad de la cinasa, que puede correlacionarse con un trastorno de proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular (es decir, a medida que aumenta el nivel de la cinasa, aumenta la gravedad de uno o más de los síntomas del trastorno celular). La sobreactividad también puede ser el resultado de una activación constitutiva o independiente del ligando como resultado de mutaciones tales como la eliminación de un fragmento de una cinasa responsable de la unión del ligando.
40

Las enfermedades o trastornos preferidos en los que los compuestos descritos en el presente documento pueden ser útiles para prevenir, incluyen cáncer, osteoporosis, trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer y trastornos virales tales como el virus de Epstein Barr, la infección por el virus del dengue y el VIH.

- 45 Por lo tanto, la presente invención proporciona además el uso de compuestos como se define en el presente documento para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades en las que es deseable inhibir una tirosina cinasa, más preferiblemente una cinasa Src. Dichas enfermedades incluyen trastornos proliferativos, osteoporosis y trastornos virales.

Selectividad

- 50 Ventajosamente, los compuestos seleccionados según la invención exhiben selectividad para una o más proteínas cinasas, más preferiblemente, una o más tirosina cinasas.

- En una realización preferida, los compuestos de la invención exhiben selectividad para la cinasa Src con respecto a una o más de otras proteínas cinasas como se mide por un ensayo de detección de cinasas apropiado. El experto en la técnica estaría familiarizado con dichos ensayos, cuyos detalles adicionales se proporcionan en la sección de
55 ejemplos adjuntos [77].

Más preferiblemente, los compuestos de la invención exhiben al menos una selectividad 2 veces mayor para la cinasa Src con respecto a una o más de otras proteínas cinasas, preferiblemente, al menos una selectividad de 5 veces, más

preferiblemente, al menos 10 veces, al menos un 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces mayor para la cinasa Src con respecto a una o más proteínas cinasas.

- 5 En una realización preferida, los compuestos de la invención exhiben al menos una selectividad 2 veces mayor para la cinasa Src- con respecto a la cinasa Abl, preferiblemente, al menos una selectividad 5 veces, más preferiblemente, al menos 10 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 250 veces, al menos 500 veces o al menos 1000 veces mayor para la cinasa Src con respecto a la cinasa Abl, por ejemplo, según se mide por la relación de $CI_{50}^{Abl}/CI_{50}^{Src}$.

Composiciones farmacéuticas

- 10 Para su uso según la presente invención, los compuestos o la sal, el éster u otro derivado fisiológicamente funcional de estos, descritos en el presente documento, pueden presentarse como una formulación farmacéutica, que comprende los compuestos o la sal, el éster u otro derivado fisiológicamente funcional de estos, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. El(los) vehículo(s) debe(n) ser aceptable(s) en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de estos. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria.

Los ejemplos de tales excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden encontrar en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

- 20 Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (edición de A. R. Gennaro. 1985).

Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

- 25 La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s), tampón(es), agente(s) saborizante(s), agente(s) tensioactivo(s), espesante(s), conservante(s) (incluidos antioxidantes) y similares, y sustancias incluidas con el fin de hacer que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario previsto

- 30 Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa fluida, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

- 35 Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saborizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

- 40 Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, tópica (incluida dérmica, bucal y sublingual), rectal o parenteral (incluida la administración subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), nasal y pulmonar, p. ej., por inhalación. La formulación puede, cuando sea apropiado, presentarse convenientemente en unidades de dosificación discretas y puede prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar un compuesto activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, moldear el producto en la formulación deseada.

- 45 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral en donde el vehículo es un sólido se presentan más preferiblemente como formulaciones de dosis unitarias tales como bolos, cápsulas o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada de compuesto activo. Se puede hacer un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos que se comprimen se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada un compuesto activo en forma fluida, como un polvo o gránulos
50 opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente lubricante, agente tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden hacer al moldear un compuesto activo con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos y, si no están recubiertos, opcionalmente pueden marcarse. Las cápsulas se pueden preparar al cargar un compuesto activo, ya sea solo o mezclado con uno o más ingredientes accesorios, en las cubiertas de cápsula y luego sellarlas de la manera habitual. Los sellos son
55 análogos a las cápsulas en donde un compuesto activo junto con cual(es)quier(a) ingrediente(s) accesorio(s) se sella en un sobre de papel de arroz. Un compuesto activo también puede formularse como gránulos dispersables, que

pueden suspenderse, por ejemplo, en agua antes de la administración, o espolvorearse sobre los alimentos. Los gránulos pueden envasarse, p. ej., en una bolsita. Las formulaciones adecuadas para administración oral en donde el vehículo es un líquido pueden presentarse como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua.

- 5 Las formulaciones para administración oral incluyen formas de dosificación de liberación controlada, p. ej., comprimidos en donde un compuesto activo se formula en una matriz de control de liberación apropiada, o se recubre con una película de control de liberación adecuada. Dichas formulaciones pueden ser particularmente convenientes para uso profiláctico.

10 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el portador es un sólido se presentan más preferiblemente como supositorios de dosis unitarias. Los portadores adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales comúnmente usados en la técnica. Los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla de un compuesto activo con el(los) portador(es) ablandado(s) o fundido(s) con posterior enfriamiento y conformación en moldes. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones o suspensiones estériles de un compuesto activo en vehículos acuosos u oleaginosos.

- 15 Las preparaciones inyectables pueden adaptarse para inyección en bolo o infusión continua. Dichas preparaciones se presentan convenientemente en recipientes de dosis unitarias o multidosis que se sellan después de la introducción de la formulación hasta que se requieren para su uso. Alternativamente, un compuesto activo puede estar en forma de polvo que se constituye con un vehículo adecuado, tal como agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

20 Un compuesto activo también puede formularse como preparaciones de depósito de acción prolongada, que pueden administrarse por inyección intramuscular o por implantación, p. ej., por vía subcutánea o intramuscular. Las preparaciones de depósito pueden incluir, por ejemplo, materiales poliméricos o hidrófobos adecuados, o resinas de intercambio iónico. Tales formulaciones de acción prolongada son particularmente convenientes para uso profiláctico.

25 Las formulaciones adecuadas para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal se presentan de tal manera que las partículas que contienen un compuesto activo y que deseablemente tienen un diámetro en el intervalo de 0,5 a 7 micras se suministran en el árbol bronquial del receptor.

30 Como una posibilidad, tales formulaciones están en forma de polvos finamente triturados que pueden presentarse convenientemente en una cápsula perforable, adecuadamente de, por ejemplo, gelatina, para usar en un dispositivo de inhalación, o alternativamente como una formulación autopropulsada que comprende un activo compuesto, un propelente líquido o gaseoso adecuado y, opcionalmente, otros ingredientes tales como un tensioactivo y/o un diluyente sólido. Los propulsores líquidos adecuados incluyen propano y los clorofluorocarbonos, y los propulsores gaseosos adecuados incluyen dióxido de carbono. También se pueden emplear formulaciones autopropulsadas en donde se dispensa un compuesto activo en forma de gotas de disolución o suspensión.

35 Dichas formulaciones autopropulsadas son análogas a las conocidas en la técnica y pueden prepararse mediante procedimientos establecidos. Adecuadamente, se presentan en un recipiente provisto de una válvula de funcionamiento manual o automático que tiene las características de pulverización deseadas; ventajosamente, la válvula es de tipo dosificado que entrega un volumen fijo, por ejemplo, de 25 a 100 microlitros, en cada operación de la misma.

40 Como una posibilidad adicional, un compuesto activo puede estar en forma de una disolución o suspensión para usar en un atomizador o nebulizador mediante el cual se emplea una corriente de aire acelerada o agitación ultrasónica para producir una fina niebla de gotitas para inhalación.

45 Las formulaciones adecuadas para administración nasal incluyen preparaciones generalmente similares a las descritas anteriormente para administración pulmonar. Cuando se dispensan, tales formulaciones deberían tener deseablemente un diámetro de partícula en el intervalo de 10 a 200 micras para permitir la retención en la cavidad nasal; esto se puede lograr, según corresponda, mediante el uso de un polvo de un tamaño de partícula adecuado o la elección de una válvula adecuada. Otras formulaciones adecuadas incluyen polvos gruesos que tienen un diámetro de partícula en el intervalo de 20 a 500 micras, para administración por inhalación rápida a través del paso nasal desde un recipiente que se mantiene cerca de la nariz, y gotas nasales que comprenden de 0,2 a 5 % p/v de un compuesto activo en disolución o suspensión acuosa u oleosa.

50 Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,1 M y preferiblemente 0,05 M o disolución salina al 0,8 %. Además, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales
55 incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer o fijos lactados. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Las formulaciones adecuadas para formulación tópica se pueden proporcionar, por ejemplo, como geles, cremas o ungüentos. Dichas preparaciones pueden aplicarse, p. ej., a una herida o úlcera, ya sea directamente extendidas sobre la superficie de la herida o úlcera o llevadas sobre un soporte adecuado, como una venda, gasa, malla o similar, que se puede aplicar a y sobre el área a tratar.

- 5 También se pueden proporcionar formulaciones líquidas o en polvo que se pueden rociar o espolvorear directamente sobre el sitio a tratar, p. ej., una herida o úlcera. Alternativamente, un portador tal como un vendaje, una gasa, una malla o similar se puede rociar o espolvorear con la formulación y luego aplicarse en el sitio a tratar.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria como se describió anteriormente, el proceso comprende poner el(los) compuesto(s) activo(s) en asociación con el vehículo, por ejemplo, mediante una mezcla.

En general, las formulaciones se preparan al asociar de manera uniforme e íntima el agente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformar el producto. La invención se extiende a métodos para preparar una composición farmacéutica que comprende poner un compuesto de fórmulas generales (I) en conjunción o asociación con un portador o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

15 Sales/ésteres

Los compuestos de la invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente y veterinariamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen sales de adición de ácido o básicas adecuadas de estos. Se puede encontrar una revisión de sales farmacéuticas adecuadas en Berge et al, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes como ácidos minerales, p. ej., ácidos hidrohálidos tales como clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato, ácido sulfúrico, sulfato de ácido fosfórico, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato y ácidos sulfónicos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que no están sustituidos o están sustituidos (p. ej., con halógeno), como el ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, como alquil (C₁-C₄)- o arilsulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, por un halógeno) como el ácido metano o p-toluenosulfónico. Las sales que no son farmacéuticas o veterinariamente aceptables pueden ser valiosas como intermediarios.

Las sales preferidas incluyen, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, lactato, gluconato, citrato, tartrato, maleato, malato, pantotenato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, digluconato, ciclopentanato, glucoheptanato, glicerofosfato, oxalato, heptanoato, hexanoato, fumarato, nicotinato, palmoato, pectinato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tartrato, lactobionato, pivolato, alcanforato, undecanoato y succinato, ácidos sulfónicos orgánicos como metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, canforsulfonato, 2-naftalenosulfonato, p-clorobencenosulfonato y p-toluenosulfonato; y ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhidrato, yoduro, sulfato, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato, ácidos fosfórico y sulfónico.

Los ésteres se forman usando ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esterifica. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que están sin sustituir o sustituidos (p. ej., con halógeno), tal como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, como alquil (C₁-C₄)- o arilsulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, por un halógeno) como el ácido metano o p-toluenosulfónico. Los hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Los alcoholes incluyen alcoanolcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden estar no sustituidos o sustituidos, p. ej., por un halógeno).

Enantiómeros/tautómeros

En todos los aspectos de la presente invención descritos previamente, la invención incluye, cuando sea apropiado, todos los enantiómeros, diastereoisómeros y tautómeros de los compuestos de la invención. El experto en la técnica reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Los enantiómeros se caracterizan por la configuración absoluta de sus centros quirales y se describen por reglas de secuenciación en *R*- y *S*- de Cahn, Ingold y Prelog. Tales convenciones son bien conocidas en la técnica (p. ej., ver 'Advanced Organic Chemistry', 3a edición, ed. March, J., John Wiley and Sons, Nueva York, 1985).

Los compuestos de la invención que contienen un centro quiral pueden usarse como una mezcla racémica, una mezcla enriquecida enantioméricamente, o la mezcla racémica puede separarse usando técnicas bien conocidas y un enantiómero individual puede usarse solo.

Estereoisómeros e isómeros geométricos

5 Algunos de los compuestos de la invención pueden existir como estereoisómeros e/o isómeros geométricos, p. ej., pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y, por lo tanto, pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de dichos agentes inhibidores, y mezclas de estos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

10 La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este se define como una en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica diferente de la masa atómica que se encuentra generalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y las sales farmacéuticamente aceptables de este incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables de este, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo como ^3H o ^{14}C , son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o tejidos de sustrato. Los isótopos tritados, es decir, ^3H y carbono 14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos como el deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas como resultado de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Por ejemplo, la invención incluye compuestos de fórmulas generales (I) donde cualquier átomo de hidrógeno ha sido reemplazado por un átomo de deuterio. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de este de esta invención generalmente pueden prepararse mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.

Profármacos

30 La invención describe, además, los compuestos de la presente invención en forma de profármaco, es decir, compuestos unidos covalentemente que liberan el fármaco original activo según la fórmula general (I) *in vivo*. Tales profármacos son generalmente compuestos de la invención en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de modo que la modificación se puede revertir tras la administración a un sujeto humano o mamífero. La reversión generalmente se lleva a cabo mediante una enzima presente de forma natural en dicho sujeto, aunque es posible que se administre un segundo agente junto con dicho profármaco para realizar la reversión *in vivo*. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente), en donde la reversión puede llevarse a cabo como una esterasa, etc. Los expertos en la técnica conocerán otros sistemas similares.

Solvatos

40 La presente invención también incluye formas de solvato de los compuestos de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

Polimorfos

45 La invención se refiere, además, a los compuestos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas (an)hidras. Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de tales formas variando ligeramente el método de purificación y/o forma de aislamiento de los disolventes usados en la preparación sintética de dichos compuestos.

Administración

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden adaptarse para administración rectal, nasal, intrabronquial, tópica (incluida bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluida subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intradérmica), intraperitoneal o intratecal. Preferiblemente, la formulación es una formulación administrada por vía oral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, es decir, en forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria, o una dosis múltiple o subunitaria de una dosis unitaria. A modo de ejemplo, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos y cápsulas de liberación sostenida, y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia.

55 Las formulaciones para administración oral en la presente invención pueden presentarse como: unidades discretas tales como cápsulas, geles, gotas, sellos, píldoras o comprimidos que contienen cada uno una cantidad

predeterminada del agente activo; como polvo o gránulos; como una disolución, emulsión o suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; o como un bolo, etc. Preferiblemente, estas composiciones contienen de 1 a 250 mg y más preferiblemente de 10-100 mg de ingrediente activo por dosis.

5 Para las composiciones para administración oral (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), el término "portador aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, p. ej., agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; cargas y portadores, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro de sodio y ácido algínico; y lubricantes
10 tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, ceras de talco, aceites y sílice coloidal. También se pueden usar agentes saborizantes como menta, aceite de gaulteria, sabor de cereza y similares. Puede ser deseable añadir un agente colorante para que la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Los comprimidos también pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica.

15 Se puede hacer un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos que se comprimen se pueden preparar al comprimir en una máquina adecuada el agente activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse al moldear en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos
20 pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo.

Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen pastillas que comprenden el agente activo en una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el agente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el agente activo
25 en un portador líquido adecuado.

Otras formas de administración comprenden disoluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular, y que se preparan a partir de disoluciones estériles o esterilizables. Las formas inyectables típicamente contienen entre 10 y 1000 mg, preferiblemente entre 10 y 250 mg de ingrediente activo por dosis.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, pomadas, cremas, geles, aerosoles, disoluciones o partículas de polvo.

Un medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche para la piel. Por ejemplo, el ingrediente activo puede incorporarse en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El ingrediente activo también se puede incorporar a una concentración de entre 1 y 10 % en peso, en
35 una pomada que consiste en una cera blanca o una base de parafina blanda blanca junto con los estabilizadores y conservantes que se requieran.

Dosificación

Una persona con experiencia en la técnica puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las composiciones de la presente invención para administrar a un sujeto sin experimentación excesiva. Típicamente, un
40 médico determinará la dosis real que será más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de medicamentos, la gravedad de la afección particular y el individuo sometido a terapia. Las dosificaciones descritas en este documento son ejemplares del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos
45 individuales en los que se merecen intervalos de dosificación más altos o más bajos, y tales están dentro del alcance de esta invención.

Según esta invención, se puede administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmulas generales (I) para inhibir la cinasa implicada con una afección o enfermedad particular. Por supuesto, esta cantidad de dosificación se modificará adicionalmente según el tipo de administración del compuesto. Por ejemplo, para lograr una "cantidad
50 eficaz" para la terapia aguda, se prefiere la administración parenteral de un compuesto de fórmula general (I) o (II). Una infusión intravenosa del compuesto en dextrosa al 5 % en agua o disolución salina normal, o una formulación similar con excipientes adecuados, es más eficaz, aunque también es útil una inyección intramuscular en bolo. Típicamente, la dosis parenteral será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg; preferiblemente entre 0,1 y 20 mg/kg, de manera que se mantenga la concentración del fármaco en el plasma a una concentración eficaz
55 para inhibir una cinasa. Los compuestos se pueden administrar de una a cuatro veces al día a un nivel para lograr una dosis diaria total de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 400 mg/kg/día. La cantidad precisa de un compuesto de la invención que es terapéuticamente eficaz y la vía por la cual dicho compuesto se administra mejor, las determina fácilmente un experto en la técnica al comparar el nivel en sangre del agente con la concentración requerida para

tener un efecto terapéutico.

Los compuestos de esta invención también pueden administrarse por vía oral al paciente, de tal manera que la concentración del fármaco sea suficiente para lograr una o más de las indicaciones terapéuticas descritas en el presente documento. Típicamente, una composición farmacéutica que contiene el compuesto se administra a una dosis oral de entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de una manera consistente con la afección del paciente. Preferiblemente, la dosis oral sería de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 mg/kg.

No se esperan efectos toxicológicos inaceptables cuando los compuestos de la presente invención se administran según la presente invención. Los compuestos de esta invención, que pueden tener una buena biodisponibilidad, se pueden analizar en uno de varios ensayos biológicos para determinar la concentración de un compuesto que se requiere para tener un efecto farmacológico dado.

Combinaciones

En una realización particularmente preferida, el uno o más compuestos de la invención se administran en combinación con uno o más de otros agentes activos, por ejemplo, fármacos existentes disponibles en el mercado. En tales casos, los compuestos de la invención pueden administrarse consecutiva, simultánea o secuencialmente con uno o más de otros agentes activos.

Los fármacos en general son más eficaces cuando se usan en combinación. En particular, la terapia combinada es deseable para evitar una superposición de toxicidades importantes, mecanismo de acción y mecanismo(s) de resistencia. Además, también es deseable administrar la mayoría de los fármacos a sus dosis máximas toleradas con intervalos de tiempo mínimos entre tales dosis. Las principales ventajas de combinar fármacos quimioterapéuticos son que se pueden promover efectos sinérgicos aditivos o posibles mediante interacciones bioquímicas y también se puede disminuir o retrasar la aparición de resistencia.

Se pueden sugerir combinaciones beneficiosas estudiando la actividad inhibitoria de los compuestos de prueba con agentes conocidos o sospechosos de ser valiosos en el tratamiento de un trastorno particular. Por ejemplo, la invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en un ensayo para identificar compuestos que promueven la actividad aditiva y sinérgica sobre las actividades anticancerígenas cuando se combinan con el compuesto. Preferiblemente, el ensayo es una detección fenotípica basada en células de alto rendimiento. Este procedimiento también se puede usar para determinar el orden de administración de los agentes, es decir, antes, simultáneamente o después del suministro. Tal programación puede ser una característica de todos los agentes activos identificados en el presente documento.

Ensayo

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en un ensayo para identificar compuestos candidatos adicionales capaces de inhibir o inhibir selectivamente una o más tirosina cinasas, más preferiblemente una cinasa de la familia Src. Preferiblemente, el compuesto candidato es capaz de inhibir selectivamente la cinasa c-Src con respecto a la cinasa Abl.

Preferiblemente, el ensayo es un ensayo de unión competitiva.

Más preferiblemente, el ensayo de unión competitiva comprende poner en contacto un compuesto de la invención con la cinasa y un compuesto candidato y detectar cualquier cambio en la interacción entre el compuesto según la invención y la cinasa.

Preferiblemente, el compuesto candidato se genera mediante modificación SAR convencional de un compuesto de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "modificación SAR convencional" se refiere a métodos estándar conocidos en la técnica para variar un compuesto dado mediante derivatización química.

Por lo tanto, en un aspecto, el compuesto identificado puede actuar como modelo (por ejemplo, una plantilla) para el desarrollo de otros compuestos. Los compuestos empleados en dicha prueba pueden estar libres en disolución, fijados a un soporte sólido, soportados en una superficie celular o ubicados intracelularmente. Se puede medir la supresión de la actividad o la formación de complejos de unión entre el compuesto y el agente que se está probando.

El ensayo de la presente invención puede ser una detección por la cual se someten a prueba varios agentes. En un aspecto, el método de ensayo de la presente invención es una detección de alto rendimiento.

Esta invención también contempla el uso de ensayos competitivos de detección de fármacos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a un compuesto compiten específicamente con un compuesto de prueba para unirse a un compuesto.

Otra técnica para la detección proporciona una detección de alto rendimiento (HTS) de agentes que tienen una afinidad de unión adecuada a las sustancias y se basa en el método descrito en detalle en la publicación internacional WO

84/03564.

Se espera que los métodos de ensayo de la presente invención sean adecuados tanto para la detección a pequeña y gran escala de compuestos de ensayo como para ensayos cuantitativos.

5 Preferiblemente, el ensayo de unión competitiva comprende poner en contacto un compuesto de la invención con una cinasa en presencia de un sustrato conocido de dicha cinasa y detectar cualquier cambio en la interacción entre dicha cinasa y dicho sustrato conocido.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para detectar la unión de un ligando a una cinasa, dicho método comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto un ligando con una cinasa en presencia de un sustrato conocido de dicha cinasa;
- 10 (ii) detectar cualquier cambio en la interacción entre dicha cinasa y dicho sustrato conocido; y en donde dicho ligando es un compuesto de la invención.

Un aspecto de la invención se refiere a un proceso que comprende las etapas de:

- (a) llevar a cabo un método de ensayo descrito anteriormente en este documento;
- (b) identificar uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando; y
- 15 (c) preparar una cantidad de dicho uno o más ligandos.

Otro aspecto de la invención proporciona un proceso que comprende las etapas de:

- (a) llevar a cabo un método de ensayo descrito anteriormente en este documento;
- (b) identificar uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando; y
- (c) preparar una composición farmacéutica que comprende dicho uno o más ligandos.

20 Otro aspecto de la invención proporciona un proceso que comprende las etapas de:

- (a) llevar a cabo un método de ensayo descrito anteriormente en este documento;
- (b) identificar uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando;
- (c) modificar dicho uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando;
- (d) llevar a cabo el método de ensayo descrito anteriormente en el presente documento;
- 25 (e) opcionalmente preparar una composición farmacéutica que comprende dicho uno o más ligandos.

La invención también se refiere a un ligando identificado por el método descrito anteriormente.

Otro aspecto más de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ligando identificado por el método descrito anteriormente en el presente documento.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un ligando identificado por el método descrito anteriormente en la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de uno o más trastornos como se describió anteriormente.

Los métodos anteriores se pueden usar para detectar un ligando útil como inhibidor de una o más cinasas.

35 Los compuestos de fórmulas generales (I) son útiles como herramientas de laboratorio y como agentes terapéuticos. En el laboratorio, ciertos compuestos de la invención son útiles para establecer si una cinasa conocida o recién descubierta contribuye con una función bioquímica esencial o al menos significativa durante el establecimiento o la progresión de un estado de enfermedad, un proceso comúnmente conocido como "validación de objetivo".

Síntesis

Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula I como se definió anteriormente, dicho proceso comprende las etapas de:

La Figura 5 muestra una transferencia Western en células MDA-MB-231 que compara el compuesto 506 con Dasatinib. El compuesto 506 indujo una fuerte inhibición de la autofosforilación de SRC (^{Y416}fosfo-SRC) y fosforilación mediada por SRC posterior de FAK (^{Y861}fosfo-FAK). Si bien Dasatinib inhibió pSRC y pFAK en las mismas concentraciones, también mostró efectos adicionales en otras vías (fuerte aumento de pAKT) y pareció estabilizar la SRC total.

- 5 La Figura 6 muestra el efecto antagonista de GNF-2 (inhibidor selectivo de Abl) con respecto a los valores de CE₅₀ del compuesto 506. Como se muestra en la figura, los valores de CE₅₀ se incrementan hasta 50 veces con 10 μM de GNF-2.

La Figura 7 muestra la migración de células MDA-MB-231 tratadas a través de una herida por rasguño en los puntos de tiempo de 6, 12 y 24 h normalizados con respecto a DMSO. Los fármacos, el compuesto 506 y Dasatinib, se usaron a 10 nM y se compararon con DMSO.

- 10 La Figura 8 muestra un ensayo de regeneración de cola de pez cebra. Procedimiento: pretratamiento de 2 horas con dasatinib o compuesto 506 a 100 μM → corte de la cola → tratamiento durante 2 horas más → lavado, toma de imágenes 2 días después. Obsérvese el agrandamiento del corazón inducido por el tratamiento con dasatinib.

- La Figura 9 muestra la detección fenotípica del inhibidor de SRC 506 en pez cebra. (a,b) Ensayo de migración de neuromastos. Se añadieron medios E3 frescos con DMSO o 506 (500 μM) a embriones de pez cebra a 20 hpf, 36 hpf y 48 hpf, y se tomaron imágenes a 72 hpf. (a) Imágenes representativas de la cola de un pez cebra de 3 dpf sin (arriba) y con tratamiento con 506 (abajo). Los neuromastos se identifican por la expresión de GFP (verde) y la punta de la cola como una línea roja. La flecha amarilla indica la distancia más corta desde la punta de la cola hasta un neuromasto. (b) Análisis de imágenes de la distancia entre el último neuromasto y la punta de la cola (n = 10) con tratamiento con DMSO (control negativo) o 506 (500 μM). Valor de p calculado a partir de la prueba de la t. (c) Estudio del desarrollo del corazón del pez cebra en tratamiento corto con 506 (500 μM) y dasatinib (10 μM). Los compuestos se añadieron a embriones de pez cebra 2 dpf y se incubaron durante 4 h (n = 5). Posteriormente, se añadieron medios frescos y se tomaron imágenes de los peces después de 48 h de incubación.
- 15
- 20

- La Figura 10 muestra el análisis inmunohistoquímico de fosfo-SRC^{Y416} en xenoinjertos tumorales humanos. (a) Imágenes de secciones representativas (baja y alta resolución) de xenoinjertos HCT116 de: (izquierda) ratones no tratados y (derecha) ratones tratados con 506 (n = 4). (b) Análisis de histopuntuación (6-7 secciones analizadas por experimento). Cuantificación de la inmunohistoquímica a través de secciones de tejido tumoral de los grupos de animales no tratados (agua) y tratados con 506 realizados con enmascaramiento. El valor de la p se calculó a partir de la prueba de la t.
- 25

Ejemplos

- 30 Materiales y métodos

Procedimientos generales para la síntesis de compuestos

Cromatografía

- La cromatografía en columna se refiere a la cromatografía en gel de sílice y se realizó manualmente usando columnas de vidrio convencionales y gel de sílice (tamaño de poro 60 Å, tamaño de partícula de malla 230-400, 40-63 μm) de Sigma-Aldrich.
- 35

Métodos analíticos

- La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) ¹H se llevó a cabo usando un espectrómetro Bruker Avance III de 500 MHz en el disolvente indicado a aproximadamente temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. En todos los casos, los datos de NMR fueron consistentes con las estructuras propuestas. Los desplazamientos químicos característicos (δ) se dan en partes por millón usando abreviaturas convencionales para la designación de los picos principales: p, s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; dd, doblete de dobletes; Br, amplio. Los espectros de masa de baja resolución (LRMS, por sus siglas en inglés) se obtuvieron usando un sistema Microsaic Systems 4000 MiD en condiciones de ionización por pulverización de electrones (ESI, por sus siglas en inglés). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés) se obtuvieron usando un espectrómetro Bruker 3.0 T Apex II. La cromatografía en capa delgada se realizó en placas Merck TLC Silica gel 60 F254; típicamente de 5 cm x 10 cm. La detección se logró usando una fuente de UV de 254 nm o tinción con permanganato.
- 40
- 45

Preparación de compuestos

- Cuando no se describe la preparación de los materiales de partida, estos están disponibles comercialmente, se conocen en la literatura o los expertos en la técnica los pueden obtener fácilmente usando procedimientos estándar. Todos los productos químicos disponibles en el mercado usados en el presente documento se obtuvieron de Fisher Scientific, Matrix Scientific, Sigma-Aldrich o VWR International Ltd. Cuando se afirma que los compuestos se prepararon de manera análoga a los ejemplos anteriores o intermediarios, el experto apreciará que el tiempo de reacción, el número de equivalentes de reactivos y la temperatura pueden modificarse para cada reacción específica.
- 50

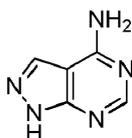
y que puede ser necesario o deseable emplear diferentes técnicas de tratamiento o purificación. Cuando las reacciones se llevaron a cabo usando irradiación de microondas, el microondas usado fue un Initiator 60 suministrado por Biotage. Las reacciones sin microondas se llevaron a cabo en una atmósfera inerte de nitrógeno usando disolventes anhidros. La potencia real suministrada varía durante el transcurso de la reacción para mantener una temperatura constante.

5 Abreviaturas

	CDCl ₃	= Cloroformo deuterado
	DCM	= Diclorometano
	Et ₂ O	= Éter dietílico
	MgSO ₄	= Sulfato de magnesio
10	DMF	= <i>N,N</i> -Dimetilformamida
	eq.	= Equivalentes
	mg	= Miligramo
	ml	= Mililitro
	mmol	= Milimoles
15	m/z	= Relación masa/carga
	MeOD	= Metanol Deuterado
	MHz	= Mega Hercio
	mw	= Microondas
	TLC	= Cromatografía de capa delgada
20	NEt ₃	= Trietilamina
	THF	= Tetrahidrofurano
	MeOH	= Metanol
	TFA	= Ácido trifluoroacético
	t.a.	= Temperatura ambiente
25	AcOH	= Ácido acético
	EtOH	= Etanol
	EtOAc	= Acetato de etilo
	UV	= Ultravioleta
	DMSO	= Dimetilsulfóxido

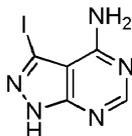
30 La síntesis de compuestos seleccionados de la invención se describe a continuación.

1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-amina:



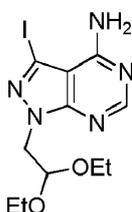
35 Se añadieron 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrilo (3 g, 27,77 mmol) y formamida (15 ml) a un vial de microondas de 20 ml y la mezcla se calentó a 180 °C durante 2 horas usando radiación de microondas. El precipitado formado al enfriar se filtró y se lavó con agua (50 ml) y se dejó secar para proporcionar el producto como un sólido crema (3,5 g, 25,92 mmol, 93%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 13,34 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,69 (br, M, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 158,19 (CH), 156,03 (C), 154,98 (C), 132,79 (CH), 99,83 (C); MS (ES + ve)[M + H]⁺: 136,0, 157,9 (+Na), (ES -ve) [M-H]⁻: 133,9.

3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



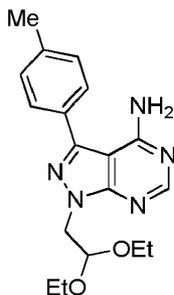
Se suspendió 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (1,5 g, 11,11 mmol) en 15 ml de DMF y se añadió N-yodosuccinimida (1,2 eq., 3,0 g, 13,34 mmol). La mezcla se calentó a 180 °C en el microondas durante una hora. Se añadió EtOH (80 ml) a la reacción y comenzó a formarse un precipitado, que fue ayudado por sonicación. El precipitado se filtró y se lavó con EtOH (x3, 20 ml) y se dejó secar en un horno a 40 °C durante la noche para dar un sólido de color arena (2,115 g, 8,105 mmol, 73,0 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 13,80 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,79 - 6,44 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 157,60 (C), 156,08 (CH), 155,04 (C), 102,50 (C), 89,82 (C); MS (ES +ve)[M + H]⁺: 283,9 (+Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 259,9, 287,8 (+ Na).

10 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



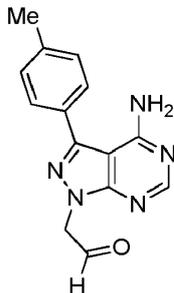
A una disolución de 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (500 mg, 1.92 mmol) en DMF (15 ml) se le añadió hidruro de sodio (1,5 eq., 2,88 mmol, dispersión en aceite mineral al 60 %, 115,2 mg) y la disolución se dejó agitar durante 30 minutos hasta que la evolución del gas había disminuido. Luego se añadió gota a gota bromoacetaldehído dietil acetal (1,5 eq. 2,88 mmol, 0,435 ml) y la mezcla se calentó a 150 °C en el microondas durante 40 minutos. Se añadieron EtOAc y agua (50 ml) a la mezcla y se separaron las fracciones orgánicas. La capa acuosa se lavó con EtOAc (50 ml, x3) y las fracciones orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (x3, 30 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna MeOH/DCM (0-5 %) para proporcionar un sólido naranja claro (461 mg, 1,22 mmol, 63,7 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,21 (s, 1H), 7,90 - 6,30 (m, 2H), 4,93 (t, J = 5,7, 1H), 4,33 (d, J = 5,8, 2H), 3,62 (dq, J = 9,4, 6,9, 2H), 3,40 (dq, J = 9,6, 7,0, 2H), 0,98 (t, J = 7,0, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 157,86 (C), 156,30 (CH), 154,03 (C), 103,18 (CH), 99,50 (C), 89,51 (C), 61,39 (CH₂), 48,76 (CH₂), 15,39 (CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 377,8, 400,0 (+Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 376,0.

1-(2,2-dietoxietil)-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



A una disolución de 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (1.135 g, 3,01 mmol) en dioxano/agua (10 ml/1 ml) se añadieron ácido p-tolilborónico (1,5 eq., 614 mg, 4,52 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 624,7 mg, 4,52 mmol) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles, 33,8 mg) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una hora. Se añadieron EtOAc y agua (50 ml) a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-5 %) para proporcionar un sólido marrón claro (902 mg, 2,64 mmol, 87,8 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,42 (s, 1H), 7,58 (d, J = 8,0, 2H), 7,34 (d, J = 7,8, 2H), 5,12 (t, J = 5,8, 1H), 4,58 (d, J = 5,8, 2H), 3,78 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 3,52 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 2,44 (s, 3H), 1,12 (t, J = 7,0, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 158,28 (C), 156,43 (C), 155,55 (CH), 145,25 (C), 139,76 (C), 131,90 (CH), 128,93 (CH), 100,49 (CH), 62,46 (CH₂), 49,53 (CH₂), 21,09 (CH₃), 15,78 (CH₃); MS (ES +ve)[M+1]⁺: 341,19, (ES -ve) [M-1]⁻: 340,0.

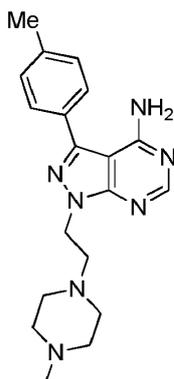
2-[4-amino-3-(p-tolil) pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído:



5 A una suspensión de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(p-tolil) pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (400 mg, 1,17 mmol) en 5 ml de agua se añadieron 5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100 °C durante 30 minutos en el microondas. La mezcla se transfirió a un RBF, se lavó con DCM y se concentró al vacío. El producto se lavó con DCM y Et₂O y se secó al vacío para dar un sólido marrón claro (suponiendo un rendimiento cuantitativo). No se obtuvieron espectros de NMR para este compuesto ya que diferentes sales del producto condujeron a espectros desordenados.

10 Compuestos 105 y 109. A una suspensión de 2-[4-amino-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído (40 mg, 0,105 mmol) en DCM (1 ml) se añadió N-dimetil-2-piperazin-1-il-etanamina o N,N-dimetilpiperidin-4-amina (1 eq., 0,105 mmol), respectivamente, y una gota de AcOH y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Luego se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (22,2 mg, 0,105 mmol) y la mezcla se agitó hasta completarse (~ 1 hora). La mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó sin ningún tratamiento adicional debido a la alta solubilidad del producto en la capa acuosa.

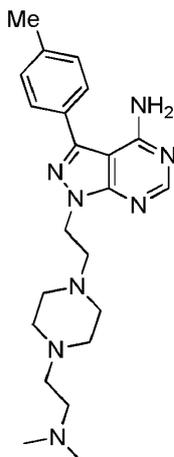
1-[2-(4-metilpiperazin-1-il) etil]-3-(p-tolil) pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (103):



15 Se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 0-10 % - 10 % MeOH con 3 gotas de NH₃ ac. por 20 ml) para proporcionar un sólido naranja pálido (20 mg, 0,057 mmol, 54,2 %) ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 7,60 (d, J = 8,1, 2H), 7,41 (d, J = 7,8, 2H), 4,57 (t, J = 6,5, 2H), 2,97 (t, J = 6,5, 2H), 2,53 (m, 8H), 2,47 (s, 3H), 2,37 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 158,02 (C), 155,87 (CH), 154,77 (C), 144,58 (C), 139,25 (C), 130,45 (C), 130,14 (CH), 128,50 (CH), 98,59 (C), 56,89 (CH)₂, 54,91 (CH₂), 52,50 (CH₂), 45,59 (CH₃), 44,60 (CH₂), 21,47 (CH₃); MS (ES +ve)[M+1]⁺: 352,0, 374,2 (+Na), (ES -ve)[M-1]⁻: 350,2; HRMS (ES + ve), C₁₉H₂₆N₇[M+H]⁺: calculado 352,22442, encontrado 352,224816.

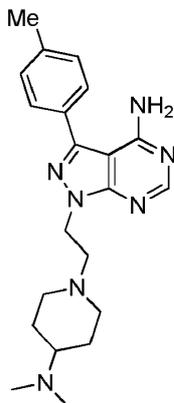
20

1-[2-[4-(2-dimetilaminoetil)piperazin-1-il]etil]-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (105):



5 Se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 5-10 % - 10 % MeOH con 25 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja pálido (5 mg, 0,0312 mmol, 11,7), ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 7,59 (d, J = 8,0, 2H), 7,41 (d, J = 8,0, 2H), 4,56 (t, J = 6,6, 2H), 2,96 (t, J = 6,6, 2H), 2,89 (t, J = 6,6, 2H), 2,76 - 2,60 (m, 6H), 2,60 (s, 6H), 2,51 (m, 4H), 2,46 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,50 (C), 155,39 (CH), 154,14 (C), 145,16 (C), 139,21 (C), 129,83 (C), 129,60 (CH), 128,10 (CH), 97,76 (C), 56,40 (CH₂), 54,64 (CH₂), 53,51 (CH₂), 52,56 (CH₂), 52,24 (CH₂), 43,79 (CH₂), 43,36 (CH₃), 19,97 (CH₃); MS (ES +ve)[M+1]⁺: 409,3, 431,2 (+Na); HRMS (ES +ve), C₂₂H₃₃N₈ [M+H]⁺: calculado 409,28227, encontrado 409,282102.

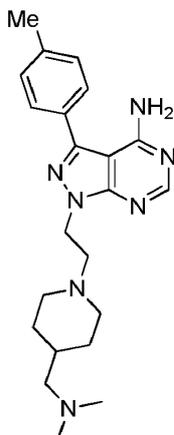
10 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (109):



15 Se purificó por cromatografía en columna (MeOH/DCM 10 % - 10 % MeOH con 20 gotas de NH₃ ac. por 50 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (13 mg, 0,034 mmol, 32,7%), ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,35 (s, 1H), 7,56 (d, J = 8,0, 2H), 7,33 (d, J = 7,8, 2H), 5,68 (s, 2H), 4,54 (t, J = 7,0, 2H), 3,08 (d, J = 11,8, 2H), 2,93 (t, J = 7,0, 2H), 2,43 (s, 3H), 2,41 (m, 1H), 2,40 (s, 6H), 2,10 (dd, J = 11,8, 9,9, 2H), 1,84 (d, J = 12,3, 2H), 1,52 (qd, J = 12,1, 3,7, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 158,16 (C), 156,04 (CH), 154,87 (C), 144,69 (C), 139,38 (C), 130,60 (C), 130,32 (CH), 128,57 (CH), 98,70 (C), 62,72 (CH), 56,96 (CH₂), 52,86 (2x CH₂), 45,13 (CH₂), 41,01 (2x CH₃), 27,71 (CH₂), 21,61 (CH₃); MS (ES +ve)[M + 1]⁺: 380,2, 402,1 (+Na); HRMS (ES +ve), C₂₁H₃₀N₇ [M+H]⁺: calculado 380,25572, encontrado 380,255345.

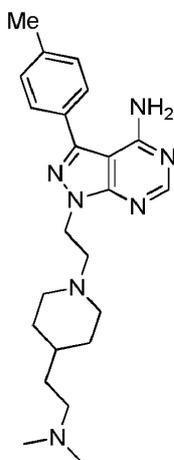
20

1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (112):



5 A una suspensión de 2-[4-amino-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído (100 mg, 0,374 mmol) en DCM (2 ml) se añadió N,N-Dimetil-1-piperidin-4-ilmetanamina (1 eq. 53,2 mg, 0,374 mmol) y una gota de AcOH y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (79,3 mg, 0,374 mmol) y la mezcla se dejó agitar durante 18 horas. La mezcla se redujo al vacío y se purificó, sin un tratamiento, mediante cromatografía en columna MeOH/DCM (0-10 % - 10 % con 10 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja claro (48 mg, 0,122 mmol, 32,6 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,30 (s, 1H), 7,55 (d, J = 8,1, 2H), 7,32 (d, J = 7,8, 2H), 4,54 (t, J = 6,8, 2H), 3,04 (d, J = 11,6, 2H), 2,95 (t, J = 6,8, 2H), 2,57 (s, 6H), 2,41 (s, 3H), 2,11 (t, J = 10,9, 2H), 1,74 (d, J = 12,6, 2H), 1,63 (s, 2H), 1,26 (m, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 158,06 (C), 155,40 (CH), 154,56 (C), 144,79 (C), 139,23 (C), 130,36 (C), 130,16 (CH), 128,40 (CH), 98,53 (C), 64,32 (CH₂), 56,97 (CH₂), 53,15 (CH₂), 44,52 (CH₂), 44,42 (CH₃), 32,62 (CH), 30,14 (CH₂), 21,44 (CH₃); MS (ES +ve)[M+1]⁺: 394,3, 416,2 (+ Na); HRMS (ES +ve), C₂₂H₃₂N₇[M+H]⁺: calculado 394,27137, encontrado 394,271595.

1-[2-[4-(2-dimetilaminoetil)-1-piperidil]etil]-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (113):

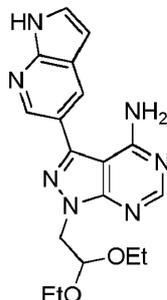


15 A una suspensión de 2-[4-amino-3-(p-tolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído (100 mg, 0,374 mmol) en DCM (2 ml) se añadió dimetil-(2-piperidin-4-il-etil)-amina (1 eq. 58,4 mg, 0,374 mmol) y una gota de AcOH y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (79,3 mg, 0,374 mmol) y la mezcla se dejó agitar durante 18 horas. La mezcla se redujo al vacío y se purificó, sin un tratamiento, mediante cromatografía en columna MeOH/DCM (0-10 % - 10 % con 0-10 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido amarillo claro (69,8 mg, 0,171 mmol, 45,8). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,25 (s, 1H), 7,59 - 7,55 (m, 2H), 7,38 (d, J = 7,8, 2H), 4,58 (t, J = 6,6, 2H), 3,14 (d, J = 11,8, 2H), 3,09 - 2,99 (m, 4H), 2,79 (s, 6H), 2,43 (s, 3H), 2,23 (t, J = 11,0, 2H), 1,74 (d, J = 12,9, 2H), 1,65 - 1,57 (m, 2H), 1,44 - 1,36 (m, 1H), 1,27 (dd, J = 21,1, 11,8, 2H); ¹³NMRC NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,50 (C), 155,45 (CH), 154,14 (C), 145,30 (C), 139,23 (C), 129,79 (C), 129,60 (CH), 128,09 (CH), 97,83 (C), 56,50 (CH₂), 55,70 (CH₂), 52,99 (2x CH₂), 43,45 (CH₂), 42,14 (2x CH₃), 32,84 (CH), 30,88 (2x CH₂), 30,64 (CH₂), 19,97 (CH₃); MS (ES +ve)[M+1]⁺: 408,1; HRMS (ES +ve), C₂₃H₃₄N₇[M+H]⁺: calculado 408,28702, encontrado 408,286812.

30 Compuestos intermediarios para 021-030: A una disolución de 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (100 mg, 0,265 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadió éster pinicol del ácido 1H-pirrolo[2,3-b]piridina-5-borónico, ácido 5-isoquinolinborónico, ácido 3,4-dimetoxifenilborónico, ácido 3-hidroxifenilborónico o ácido furano-3-borónico (1,5 eq., 0,397 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 54,8 mg, 0,397 mmol), trifenilfosfina (20 % en moles, 20,8 mg) y acetato de paladio (5 % en moles, 4,5 mg) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una

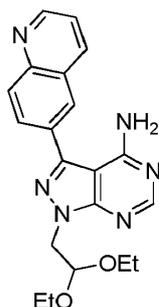
hora. Se añadieron EtOAc (50 ml) y agua (50 ml) a la mezcla y la capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío.

1-(2,2-dietoxietil)-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



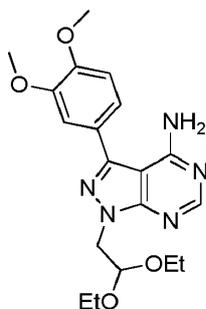
- 5 Se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-6%) para proporcionar un sólido blanco (93 mg, 0,253 mmol, 95,6 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9,53 (s, 1H), 8,62 (d, J = 1,9, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,24 (d, J = 2,0, 1H), 7,45 (d, J = 3,4, 1H), 6,62 (d, J = 3,5, 1H), 6,29 - 5,86 (br, s, 2H), 5,14 (t, J = 5,7, 1H), 4,62 (d, J = 5,7, 2H), 3,79 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 3,55 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 1,14 (t, J = 7,0, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156,75 (C), 154,58 (C), 153,42 (CH), 148,87 (C), 143,78 (C), 142,83 (CH), 128,83 (CH), 126,85 (CH), 121,30 (C), 120,46 (C), 101,80 (CH), 99,93 (CH), 98,47 (C), 62,17 (2x CH₂), 49,33 (CH₂), 15,34 (2x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 368,2, 390,2 (+Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 366,2; HRMS (ES +ve), C₁₈H₂₂N₇O₂ (M+H)⁺: calculado 368,18295, encontrado 368,18090.

1-(2,2-dietoxietil)-3-(6-quinolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



- 15 Se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-5%) para proporcionar un sólido naranja pálido (86 mg, 0,227 mmol, 85,8 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,39 (s, 1H), 8,59 (d, J = 6,0, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,16 (d, J = 8,2, 1H), 7,93 (dd, J = 7,1, 1,2, 1H), 7,84 (d, J = 6,0, 1H), 7,79 (dd, J = 8,2, 7,2, 1H), 5,18 (t, J = 5,7, 1H), 4,68 (d, J = 5,8, 2H), 3,83 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 3,58 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 1,21 - 1,13 (m, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 157,36 (C), 155,87 (CH), 154,77 (C), 152,99 (CH), 144,34 (CH), 141,21 (C), 134,32 (C), 132,29 (CH), 129,43 (CH), 129,32 (C), 128,98 (C), 127,01 (CH), 118,25 (CH), 99,92 (C), 99,80 (CH), 61,94 (2x CH₂), 49,18 (CH₂), 15,23 (2x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 379,2, 401,2 (+Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 377,2; HRMS (ES +ve), C₂₀H₂₃N₆O₂ (M+H)⁺: calculado 379,18770, encontrado 379,18660.

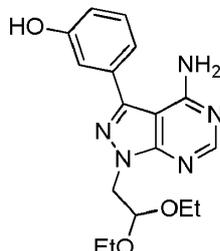
1-(2,2-dietoxietil)-3-(3,4-dimetoxifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



- 25 Se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-2 %) para proporcionar un sólido amarillo pálido (97 mg, 0,251 mmol, 94,5 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (s, 1H), 7,23 - 7,19 (m, 2H), 7,02 (d, J = 8,7, 1H), 5,94 (s, 2H), 5,12 (t, J = 5,7, 1H), 4,57 (d, J = 5,8, 2H), 3,97 (d, J = 9,8, 6H), 3,78 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 3,53 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 1,13 (t, J = 7,0, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 157,59 (C), 155,28 (CH), 154,78 (C), 149,94 (C), 149,69 (C), 144,70 (C), 125,68 (C), 120,81 (CH), 111,61 (CH), 111,56 (CH), 99,82 (CH), 98,32 (C), 61,81 (2x CH₂), 56,06 (2x CH₃),

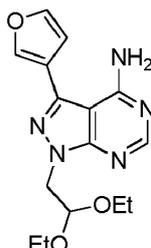
48,88 (CH₂), 15,19 (2x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 388,2, (ES -ve)[M-H]⁻: 368,2; HRMS (ES +ve), C₁₉H₂₆N₅O₄ (M + H)⁺: calculado 388,19793, encontrado 388,19620.

3-[4-amino-1-(2,2-dietoxietil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenol:



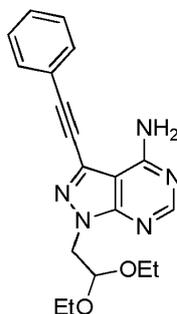
5 Se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-3 %) para proporcionar un sólido crema (80 mg, 0,233 mmol, 88,0 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,45 (s, 1H), 7,38 (t, J = 7,9, 1H), 7,20 (d, J = 7,5, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,95 (d, J = 8,1, 1H), 5,89 (s, 2H), 5,10 (t, J = 5,7, 1H), 4,57 (d, J = 5,7, 2H), 3,76 (tt, J = 14,1, 7,0, 2H), 3,52 (tt, J = 14,1, 7,0, 2H), 1,11 (t, J = 7,0, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 157,10 (C), 155,85 (CH), 153,86 (C), 152,23 (C), 145,53 (C), 133,41 (C), 131,04 (CH), 120,31 (CH), 117,10 (CH), 115,15 (CH), 99,75 (CH), 97,78 (C), 62,16 (2x CH₂), 49,22 (CH₂), 15,17 (2x CH₃); MS (ES +ve)[M + H]⁺: 344,2, 366,2 (+Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 342,2; HRMS (ES +ve), C₁₇H₂₂N₅O₃ (M+H)⁺: calculado 344,17172, encontrado 344,17000.

1-(2,2-dietoxietil)-3-(3-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



15 Se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-2%) para proporcionar un sólido de color crema (66,8 mg, 0,211 mmol, 79,5 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (s, 1H), 7,83 (dd, J = 1,4, 0,9, 1H), 7,61 (t, J = 1,7, 1H), 6,77 (dd, J = 1,8, 0,8, 1H), 5,82 (s, 2H), 5,09 (t, J = 5,8, 1H), 4,55 (d, J = 5,8, 2H), 3,76 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 3,52 (dq, J = 9,4, 7,0, 2H), 1,11 (t, J = 7,0, 6H); ¹³NMRC NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 156,93 (C), 154,38 (C), 154,12 (CH), 144,66 (CH), 141,11 (CH), 136,98 (C), 118,52 (C), 110,29 (CH), 99,73 (CH), 98,61 (C), 61,92 (2x CH₂), 49,04 (CH₂), 15,17 (2x CH₃); MS (ES +ve)[M + H]⁺: 318,2, 340,2 (+Na), 657,2 (2M +Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 317,2; HRMS (ES +ve), C₁₅H₂₀N₅O₃ (M+H)⁺: calculado 318,15607, encontrado 318,15400.

1-(2,2-dietoxietil)-3-(2-feniletinil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:

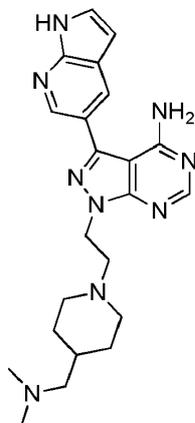


25 A una disolución de 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (100 mg, 0,265 mmol) en THF (5 ml) se agregó fenilacetileno (1,5 eq., 0,397 mmol, 40,5 mg, 37,7 μl), trietilamina (1m5 eq., 0,397 mmol, 29,1 μl), acetato de paladio (5 % en moles, 4,5 mg), trifetilfosfina (20 % en moles, 20,8 mg) y yoduro de cobre (5 % en moles, 2,5 mg). La mezcla se calentó convencionalmente a 70 °C durante 2 horas. Se añadieron EtOAc y agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ y se concentró *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-2 %) para proporcionar un sólido amarillo claro (52 mg, 0,148 mmol, 55,9 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,90 - 8,35 (m, 1H), 7,59 (dd, J = 7,7, 1,7, 2H), 7,45 - 7,36 (m, 3H), 6,20 (s, 2H), 5,09 (t, J = 5,6, 1H), 4,53 (d, J = 5,7, 2H), 3,74 (dq, J = 9,3, 7,0, 2H), 3,50 (dq, J = 14,4, 7,2, 2H), 1,10 (t, J = 7,0, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 153,88 (CH), 131,82 (2x CH), 129,58 (CH), 128,67 (2x CH), 121,45 (C), 99,81 (CH), 94,33 (C), 80,63 (C), 62,07 (2x CH₂), 49,41 (CH₂), 15,16 (2x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 352,2, 725,2 (2M +Na), (ES -ve)[M-H]⁻: 350,2; HRMS

30

(ES +ve), C₁₉H₂₂N₅O₂ (M + H)⁺: calculado 352,17680, encontrado 352,17680.

1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (221):

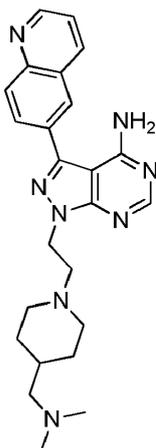


5 Se añadieron 60 mg, 0,163 mmol, de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un vial de microondas de 20 ml. Se añadieron 5 ml de agua y posteriormente 5 ml de TFA y la mezcla se calentó convencionalmente a 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para dejar un aceite marrón claro que se usó sin purificación adicional. Se disolvieron 0,163 mmol de 2-[4-amino-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidina-1-il]acetaldehído en 2 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil)metanamina (1,5 eq., 0,245 mmol, 34,8 mg) y posteriormente una gota de ácido acético. Se dejó agitar la mezcla durante 10 minutos, después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,245 mmol, 51,9 mg) y se dejó agitar la mezcla durante 2 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 % después 10 % con 5-20 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja claro (15,3 mg, 0,0365 mmol, 14,9 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,52 (s, 1H), 8,29 (d, J = 2,0, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,52 (d, J = 3,5, 1H), 6,62 (d, J = 3,5, 1H), 4,64 (t, J = 6,4, 2H), 3,25 (d, J = 11,7, 2H), 3,13 (t, J = 6,3, 2H), 2,96 (d, J = 7,2, 2H), 2,84 (s, 6H), 2,37 (t, J = 11,4, 2H), 1,88 (m, 1H), 1,80 (d, J = 13,1, 2H), 1,36 - 1,31 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 161,79 (C), 158,65 (C), 155,54 (CH), 154,33 (C), 148,16 (C), 143,72 (C), 141,84 (CH), 128,67 (CH), 127,12 (CH), 120,73 (C), 100,63 (CH), 98,19 (C), 62,67 (CH₂), 56,31 (CH₂), 52,22 (2x CH₂), 43,41 (CH₂), 42,72 (2x CH₃), 30,93 (CH), 28,39 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 420,2; HRMS (ES +ve), C₂₂H₂₉N₉[M+H]⁺: calculado 420,25404, encontrado 420,254249.

10

15

1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-(6-quinolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (223):



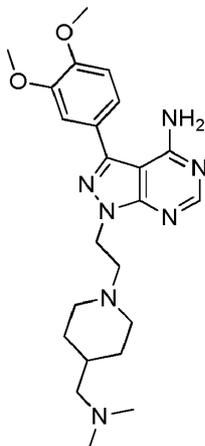
20 Se añadieron 60 mg, 0,159 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(6-quinolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un vial de microondas de 20 ml. Se añadieron 5 ml de agua y posteriormente 5 ml de TFA y la mezcla se calentó convencionalmente a 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón que se usó sin purificación adicional. Se disolvieron 0,159 mmol de 2-[4-amino-3-(6-quinolil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído en 2 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil) metanamina (1,5 eq., 0,238 mmol, 33,9 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,238 mmol, 50,4 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 % después 20 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido fluorescente de color amarillo, 48,9 mg, 0,122 mmol, 70,6 %. ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 9,37 (s, 1H), 8,47 (d, J = 6,0, 1H), 8,31 (m, 2H), 7,99 (dd, J = 7,1, 1,2, 1H), 7,90 - 7,84 (m, 2H), 4,65 (t, J = 6,7, 2H), 3,09 (d, J = 11,7, 2H), 2,99 (t, J = 6,7, 2H), 2,28 (s, 6H), 2,27 (m, 2H), 2,18 - 2,11 (m, 2H), 1,75 (d, J =

25

30

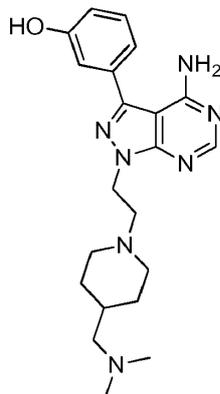
12,4, 2H), 1,57 (ddd, J = 11,3, 7,4, 3,9, 1H), 1,24 - 1,12 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,26 (C), 155,67 (CH), 154,06 (C), 152,47 (CH), 142,47 (CH), 141,58 (C), 134,67 (C), 132,89 (CH), 129,35 (CH), 129,21 (c), 129,11 (C), 127,33 (CH), 118,82 (CH), 99,55 (C), 65,35 (CH₂), 56,79 (CH₂), 53,22 (2x CH₂), 44,34 (2x CH₃), 44,05 (CH₂), 33,06 (CH), 30,04 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 431,2; HRMS (ES +ve), C₂₄H₃₀N₉[M+H]⁺: calculado 431,25879, encontrado 431,258695.

3-(3,4-dimetoxifenil)-1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (224):



Se añadieron 70 mg, 0,181 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(3,4-dimetoxifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un vial de microondas de 20 ml. Se añadieron 5 ml de agua y posteriormente 5 ml de TFA y la mezcla se calentó convencionalmente a 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para dejar un aceite marrón claro que se usó sin purificación adicional. Se disolvieron 0,181 mmol de 2-[4-amino-3-(3,4-dimetoxifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído en 4 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil) metanamina (1,5 eq., 0,271 mmol, 38,5 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,271 mmol, 57,4 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 %, después 10 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido amarillo claro (14,5 mg, 0,033 mmol, 20,8 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,26 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,25 (d, J = 8,2, 1H), 7,14 (d, J = 8,2, 1H), 4,63 (t, J = 6,3, 2H), 3,91 (s, 6H), 3,18 (s, 2H), 2,98 (d, J = 7,2, 2H), 2,85 (s, 6H), 2,45 (m, 2H), 1,92 (m, 1H), 1,83 (d, J = 13,2, 2H), 1,35 (dd, J = 22,2, 11,5, 2H); ¹³NMRC NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,58 (C), 155,51 (CH), 154,22 (C), 150,22 (C), 149,67 (C), 145,44 (C), 125,19 (C), 120,91 (CH), 111,94 (CH), 111,73 (CH), 97,82 (C), 62,49 (CH₂), 56,18 (CH₂), 55,13 (2x CH₃), 52,16 (2x CH₂), 43,08 (CH₂), 42,69 (2x CH₃), 30,70 (CH), 28,13 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 440,2; HRMS (ES +ve), C₂₃H₃₃N₇O₂[M+H]⁺: calculado 440,26902, encontrado 440,268379.

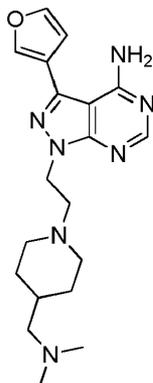
3-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenol (225):



Se añadieron 60 mg, 0,175 mmol de 3-[4-amino-1-(2,2-dietoxietil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenol a un vial de microondas de 20 ml. Se añadieron 5 ml de agua y posteriormente 5 ml de TFA y la mezcla se calentó convencionalmente a 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para dejar un aceite marrón claro que se usó sin purificación adicional. Se disolvieron 0,175 mmol de 2-[4-amino-3-(3-hidroxifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído en 4 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil)metanamina (1,5 eq., 0,262 mmol, 37,2 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,262 mmol, 55,5 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 20 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-20

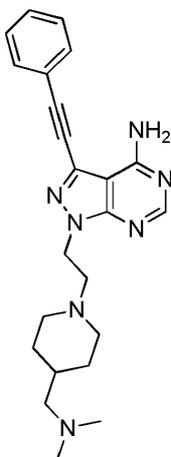
gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja oscuro (5,5 mg, 0,0139 mmol, 8,0 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,26 (s, 1H), 7,39 (t, J = 7,9, 1H), 7,17 - 7,09 (m, 2H), 6,95 (dd, J = 7,8, 2,1, 1H), 4,57 (t, J = 6,7, 2H), 3,08 (d, J = 11,7, 2H), 2,96 (t, J = 6,7, 2H), 2,47 (m, 8H), 2,16 (t, J = 11,0, 2H), 1,74 (d, J = 12,9, 2H), 1,64 (m, 1H), 1,21 (dd, J = 21,1, 12,0, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,44 (C), 158,06 (C), 155,42 (CH), 154,06 (C), 145,17 (C), 133,97 (C), 130,16 (CH), 119,09 (CH), 115,96 (CH), 114,92 (CH), 97,73 (C), 64,57 (CH₂), 56,66 (CH₂), 52,78 (2x CH₂), 43,83 (2x CH₃), 43,77 (CH₂), 32,46 (CH), 29,58 (2x CH₂), MS (ES +ve)[M+H]⁺: 396,4; HRMS (ES +ve), C₂₁H₂₉N₇O [M+H]⁺: calculado 396,24281, encontrado 396,242971.

1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-(3-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (226):



10 Se añadieron 52 mg, 0,164 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(3-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un vial de microondas de 20 ml. Se añadieron 5 ml de agua y posteriormente 5 ml de TFA y la mezcla se calentó convencionalmente a 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para dejar un aceite marrón claro que se usó sin purificación adicional. Se disolvieron 0,164 mmol de 2-[4-amino-3-(3-furil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído en 4 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil)metanamina (1,5 eq., 0,246 mmol, 35,0 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,246 mmol, 52,1 mg) y la mezcla se dejó agitar durante el fin de semana. La mezcla se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 %, después 10-20 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón dorado oscuro (45,7 mg, 0,124 mmol, 75,5 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,23 (s, 1H), 7,96 (dd, J = 1,4, 0,9, 1H), 7,71 (t, J = 1,7, 1H), 6,82 (dd, J = 1,8, 0,8, 1H), 4,53 (t, J = 6,7, 2H), 3,08 (d, J = 11,7, 2H), 2,94 (t, J = 6,7, 2H), 2,62 (d, J = 6,6, 2H), 2,57 (s, 6H), 2,16 (dd, J = 11,8, 10,0, 2H), 1,72 (d, J = 12,9, 2H), 1,68 (m, 1H), 1,26 - 1,18 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,57 (C), 155,45 (CH), 153,98 (C), 144,34 (CH), 141,47 (CH), 137,22 (C), 118,30 (C), 109,73 (CH), 98,17 (C), 63,97 (CH₂), 56,59 (CH₂), 52,62 (2x CH₂), 43,73 (CH₂), 43,43 (2x CH₃), 32,02 (CH), 29,27 (2x CH₂), MS (ES +ve)[M + H]⁺: 370,2; HRMS (ES +ve), C₁₉H₂₇N₇O [M+H]⁺: calculado 370,22716, encontrado 370,227049.

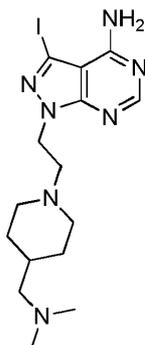
25 1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-(2-feniletinil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (230):



30 Se añadieron 50 mg, 0,142 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(2-feniletinil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un vial de microondas de 20 ml. Se añadieron 5 ml de agua y posteriormente 5 ml de TFA y la mezcla se calentó convencionalmente a 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para dejar un aceite marrón oscuro que se usó sin purificación adicional. Se suspendieron 0,142 mmol de 2-[4-amino-3-(2-feniletinil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído en 4 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil)metanamina (1,5 eq., 0,213 mmol, 30,3 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió

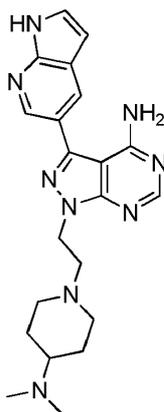
triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,213 mmol, 45,1 mg) y la mezcla se dejó agitar durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 %, después 5-10 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja oscuro (23,4 mg, 0,058 mmol, 40,7 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,23 (s, 1H), 7,69 - 7,61 (m, 2H), 7,46 - 7,40 (m, 3H), 4,51 (t, J = 6,7, 2H), 3,02 (d, J = 11,7, 2H), 2,90 (t, J = 6,7, 2H), 2,29 (s, 6H), 2,28 - 2,25 (m, 2H), 2,10 (td, J = 11,8, 2,3, 2H), 1,71 (d, J = 12,8, 2H), 1,54 (dtd, J = 14,6, 7,5, 3,7, 1H), 1,15 (qd, J = 12,5, 3,7, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,22 (C), 156,07 (CH), 153,13 (C), 131,48 (CH x2), 129,25 (CH), 128,38 (CH x2), 126,72 (C), 121,47 (C), 100,98 (C), 93,76 (C), 79,88 (C), 65,21 (CH₂), 56,68 (CH₂), 52,96 (CH₂ x2), 44,27 (CH₃ x2), 44,22 (CH₂), 32,94 (CH), 29,92 (CH₂ x2); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 404,3; HRMS (ES +ve), C₂₃H₂₉N₇ [M+H]⁺: calculado 404,24790, encontrado 404,247888.

10 1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (232):



Se añadieron 75 mg, 0,199 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 10 ml. Se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100 °C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para proporcionar un sólido blanco que se usó sin purificación adicional. Se suspendieron 0,199 mmol de 2-(4-amino-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetil-1-(4-piperidil)metanamina (1,5 eq., 0,299 mmol, 42,2 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,299 mmol, 63,4 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 % después 5-15 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido de color amarillo claro (63,6 mg, 0,148 mmol, 74,5 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,20 (s, 1H), 4,49 (t, J = 6,7, 2H), 3,01 (d, J = 11,7, 2H), 2,87 (t, J = 6,7, 2H), 2,28 (s, 6H), 2,27 (d, 2H), 2,10 (td, J = 11,8, 2,3, 2H), 1,72 (d, J = 13,0, 2H), 1,55 (dtd, J = 15,0, 7,6, 3,8, 1H), 1,15 (qd, J = 12,3, 3,7, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,05 (C), 155,63 (CH), 153,58 (C), 103,66 (C), 86,95 (C), 65,27 (CH₂), 56,73 (CH₂), 52,96 (2x CH₂), 44,30 (2x CH₃), 44,15 (CH₂), 32,97 (CH), 30,09 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 430,2.

25 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (402):

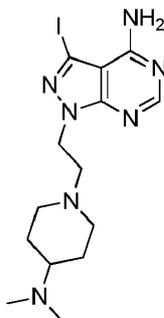


Se añadieron 40 mg, 0,109 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 10 ml. Después se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100 °C durante 30 minutos en el microondas. Los disolventes se retiraron *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón oscuro que se usó sin purificación adicional. Se disolvieron 0,109 mmol de 2-[4-amino-3-(1H-pirrolo[2,3-b]piridin-5-il)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]acetaldehído en 3 ml de THF. Se añadió N,N-dimetilpiperidina-4-amina (1,5 eq., 0,1635 mmol, 20,9 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 5 minutos. Después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,1635 mmol, 34,7 mg) y la mezcla se dejó agitar durante una hora. La mezcla de reacción se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 5-40 gotas de NH₃ ac. por 50 ml) para proporcionar un sólido amarillo claro (26,9 mg, 0,0664 mmol, 60,9 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,50 (d, J = 1,9, 1H), 8,28 (d, J = 2,0, 1H), 8,27 (s, 1H), 7,51 (d, J = 3,5, 1H), 6,62 (d, J = 3,5, 1H), 4,56 (t, J = 6,4, 2H), 3,19 (d, J =

12,1, 2H), 3,06 (tt, $J = 12,0, 3,9, 1H$), 2,97 (t, $J = 6,4, 2H$), 2,77 (s, 6H), 2,18 (t, $J = 11,1, 2H$), 2,00 (d, $J = 12,4, 2H$), 1,58 (qd, $J = 12,3, 3,9, 2H$); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,64 (C), 155,49 (CH), 154,32 (C), 148,16 (C), 143,50 (C), 141,84 (CH), 128,66 (CH), 127,12 (CH), 120,78 (C), 120,73 (C), 100,63 (CH), 98,08 (C), 63,37 (CH), 55,82 (CH₂), 51,54 (2xCH₂), 44,11 (CH₂), 39,16 (2xCH₃), 26,18 (2xCH₂); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 406,6; HRMS (ES +ve), C₂₁H₂₈N₉ (M+H)⁺: calculado 406,24622, encontrado 406,24490.

5

1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



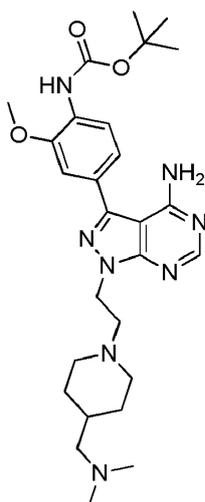
Se añadieron 150 mg, 0,398 mmol, de 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 10 ml. Se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100°C durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para proporcionar un sólido blanco que se usó sin purificación adicional. Se suspendieron 0,398 mmol de 2-(4-amino-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il) acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetilpiperidina-4-amina (1,5 eq., 0,598 mmol, 76,6 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,598 mmol, 126,8 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas durante la noche. La mezcla se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 % después 5-20 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja/marrón claro (163,8 mg, 0,405 mmol, 99,1 %). 1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,22 (s, 1H), 4,49 (t, $J = 6,4, 2H$), 3,32 (s, 3H), 3,15 (d, $J = 12,1, 2H$), 2,96 (ddd, $J = 16,0, 8,0, 4,0, 1H$), 2,91 (t, $J = 6,4, 2H$), 2,72 (s, 6H), 2,15 (td, $J = 12,0, 2,0, 2H$), 2,04 - 1,96 (m, 2H), 1,54 (qd, $J = 12,2, 3,9, 2H$); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,07 (C), 155,67 (CH), 153,70 (C), 103,59 (C), 86,97 (C), 63,18 (CH), 55,86 (CH₂), 51,38 (2x CH₂), 44,37 (CH₂), 39,31 (2x CH₃), 26,42 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 416,2.

10

15

20

N-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (503):



A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilaminometil)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1165 mmol) en dioxano/ agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadió ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 46,7 mg, 0,175 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 24,2 mg, 0,175 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,2 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 45 minutos. Se añadieron EtOAc (50 ml) y agua (50 ml) a la mezcla y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se lavó con EtOAc (20 ml, x3) y las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y concentrado *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 %, después 5-20 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón oscuro (36,5 mg, 0,0696 mmol, 59,7 %). 1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 8,08 (d, $J = 8,2, 1H$), 7,30 (d, $J = 1,8, 1H$), 7,26 (dd, $J = 8,2, 1,8, 1H$), 4,58 (t, $J = 6,8, 2H$), 3,98 (s, 3H), 3,08 (d, $J = 11,7, 2H$), 2,96 (t, $J = 6,8, 2H$), 2,34 (s, 6H), 2,32 (d, $J = 7,2, 2H$), 2,16 (dd, $J = 11,8, 9,6, 2H$), 1,76 (d, $J = 12,3,$

25

30

2H), 1,63 - 1,58 (m, 1H), 1,57 (s, 9H), 1,24 - 1,16 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,52 (C), 155,40 (CH), 154,07 (C), 153,46 (C), 149,24 (C), 145,04 (C), 128,77 (C), 127,39 (C), 120,43 (CH), 119,56 (CH), 110,29 (CH), 97,78 (C), 80,18 (C), 65,19 (CH₂), 56,76 (CH₂), 55,08 (CH₃), 52,96 (2x CH₂), 44,24 (2x CH₃), 43,79 (CH₂), 32,92 (CH), 29,89 (2x CH₂), 27,22 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 525,4, (ES -ve)[M-H]⁻: 523,3; HRMS (ES +ve), C₂₇H₄₁N₈O₃ (M+H)⁺: calculado 525,32961, encontrado 525,32890.

5

N-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (506):



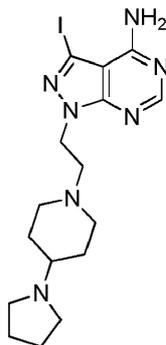
A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/ agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadió ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 48,3 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una hora. Se añadieron EtOAc (50 ml) y agua (50 ml) a la mezcla y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se lavó con EtOAc (20 ml, x2) y las fracciones orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 %, después 5-20 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (23,1 mg, 0,0453 mmol, 37,6 %). ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 8,08 (d, J = 8,2, 1H), 7,30 (d, J = 1,8, 1H), 7,26 (dd, J = 8,2, 1,9, 1H), 4,56 (t, J = 6,7, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,14 (d, J = 11,9, 2H), 2,94 (t, J = 6,7, 2H), 2,39 (m, 7H), 2,14 (dd, J = 12,0, 10,0, 2H), 1,90 (d, J = 12,5, 2H), 1,57 (s, 9H), 1,49 (qd, J = 12,1, 3,6, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,53 (C), 155,40 (CH), 154,12 (C), 153,46 (C), 149,24 (C), 145,02 (C), 128,78 (C), 127,38 (C), 120,43 (CH), 119,56 (CH), 110,28 (CH), 97,73 (C), 80,18 (C), 62,29 (CH), 56,22 (CH₂), 55,07 (CH₃), 52,20 (2x CH₂), 44,00 (CH₂), 40,06 (2x CH₃), 27,24 (2x CH₂), 27,21 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 511,3; HRMS (ES +ve), C₂₆H₃₈N₈O₃[M + H]⁺: calculado 511,31396, encontrado 511,3151.

10

15

20

3-yodo-1-[2-(4-pirrolidin-1-il-1-piperidil) etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:

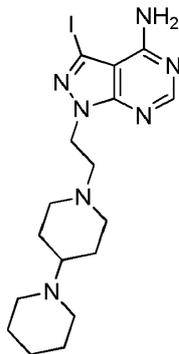


Se añadieron 300 mg, 0,8646 mmol de 1-(1,3-dioxolan-2-ilmetil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 10 ml. Se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100 °C durante 3 horas. El producto se concentró *in vacuo* y se usó sin purificación adicional. Se suspendieron 0,432 mmol de 2-(4-amino-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió 4-(1-pirrolidinil)piperidina (1,5 eq., 0,648 mmol, 99,9 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,648 mmol, 137,3 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 %) para proporcionar un sólido verde/marrón (183,1 mg, 0,415 mmol, 96,1 %). ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,22 (s, 1H), 4,50 (t, J = 6,3, 2H), 3,34 (m, 4H), 3,12 (d, J = 12,0, 2H), 3,06 (dd, J = 13,9, 9,7, 1H), 2,90 (t, J = 6,3, 2H), 2,21 - 2,00 (m, 8H), 1,52 (td, J = 12,1, 8,1, 2H); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 442,2

25

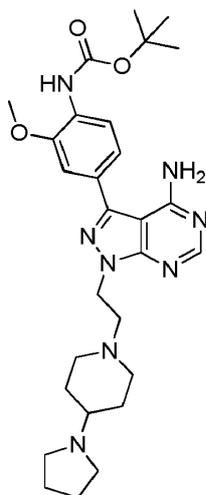
30

3-yodo-1-[2-[4-(1-piperidil)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



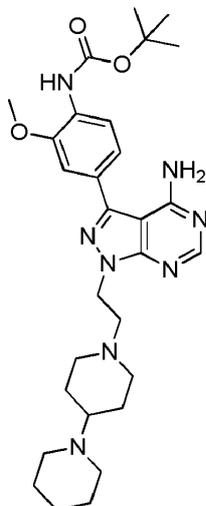
Se añadieron 300 mg, 0,8646 mmol de 1-(1,3-dioxolan-2-ilmetil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 10 ml. Se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100°C durante 3 horas. El producto se concentró *in vacuo* y se usó sin purificación adicional. Se suspendieron 0,432 mmol de 2-(4-amino-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió 1,4-bipiperidina (1,5 eq., 0,648 mmol, 108,9 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,648 mmol, 137,3 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 %) para proporcionar un aceite espeso verde/marrón oscuro (191,6 mg, 0,421 mmol, 97,5 %). ¹H NMR (601 MHz, DMSO) δ 8,21 (s, 1H), 4,38 (t, J = 6,6, 2H), 2,85 (broad m, 9H), 1,98 (m, 2H), 1,54 (broad m, 10H); MS (ES +ve) (M + H)⁺: 456,2

N-[4-[4-amino-1-[2-(4-pirrolidin-1-il-1-piperidil)etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (518):



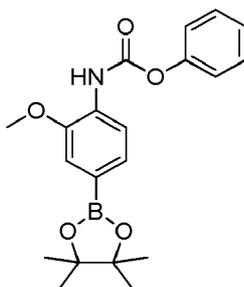
A una disolución de 3-yodo-1-[2-(4-pirrolidin-1-il-1-piperidil)etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,113 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadió ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 45,4 mg, 0,170 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 23,5 mg, 0,170 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 8,9 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una hora. Se añadieron EtOAc (50 ml) y agua (50 ml) a la mezcla y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se lavó con EtOAc (20 ml, x2) y las fracciones orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera, después se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 %, después 5-25 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido naranja claro (16,69 mg, 31,12 μmol, 27,5 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 8,08 (d, J = 8,2, 1H), 7,30 (d, J = 1,8, 1H), 7,25 (dd, J = 8,2, 1,8, 1H), 4,56 (t, J = 6,6, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,12 (d, J = 12,0, 2H), 2,94 (m, 6H), 2,53 (m, 1H), 2,15 (t, J = 11,1, 2H), 2,01 (d, J = 12,2, 2H), 1,93 (dd, J = 8,3, 5,0, 4H), 1,57 (s, 9H), 1,55 - 1,48 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,52 (C), 155,40 (CH), 154,15 (C), 153,45 (C), 149,24 (C), 145,00 (C), 128,80 (C), 127,36 (C), 120,43 (CH), 119,55 (CH), 110,27 (CH), 97,69 (C), 80,19 (C), 62,00 (CH), 56,16 (CH₂), 55,08 (CH₃), 51,62 (2x CH₂), 51,22 (2x CH₂), 44,01 (CH₂), 29,65 (2x CH₂), 27,22 (3x CH₃), 22,49 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 537,4, (ES -ve)[M-H]⁻: 535,3; HRMS (ES +ve), C₂₈H₄₀N₈O₃[M + H]⁺: calculado 537,32961, encontrado 537,3281.

N-[4-[4-amino-1-[2-[4-(1-piperidil)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (519):



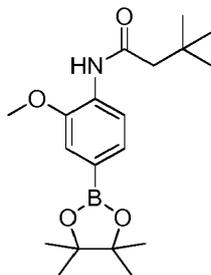
5 A una disolución de 3-yodo-1-[2-[4-(1-piperidil)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,110 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 44,0 mg, 0,165 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 22,8 mg, 0,165 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 5,8 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una hora. Se añadieron EtOAc (50 ml) y agua (50 ml) a la mezcla y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se lavó con EtOAc (20 ml, x2) y las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10%, después 5-15 gotas de NH₃ ac. por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (12,3 mg, 22,35 μmol, 20,3 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 8,08 (d, *J* = 8,2, 1H), 7,30 (d, *J* = 1,7, 1H), 7,26 (dd, *J* = 8,2, 1,8, 1H), 4,55 (t, *J* = 6,6, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,15 (d, *J* = 11,8, 2H), 2,93 (t, *J* = 6,6, 2H), 2,74 (br, s, 4H), 2,51 (br, s, 1H), 2,13 (t, *J* = 11,1, 2H), 1,91 (d, *J* = 12,0, 2H), 1,72 - 1,62 (m, 4H), 1,55 (m, 13H); ¹³NMRC NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,52 (C), 155,40 (CH), 154,13 (C), 153,45 (C), 149,24 (C), 145,02 (C), 128,79 (C), 127,37 (C), 120,43 (CH), 119,56 (CH), 110,28 (CH), 97,73 (C), 80,19 (C), 62,69 (CH), 56,21 (CH₂), 55,08 (CH₃), 52,43 (2x CH₂), 49,83 (2x CH₂), 44,00 (CH₂), 27,22 (3x CH₃), 26,78 (2x CH₂), 24,68 (2x CH₂), 23,34 (CH₂); MS (ES +ve) [M+H]⁺: 551,2; HRMS (ES +ve), C₂₉H₄₂N₈O₃[M+H]⁺: calculado 551,34526, encontrado 551,3469.

N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]carbamato de fenilo:



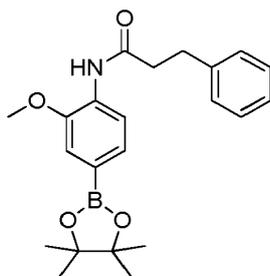
20 A una disolución de ácido 4-amino-3-metoxibencenoborónico, éster de pinacol (150 mg, 0,602 mmol) en DCM (2 ml) se agregó trietilamina (1,2 eq., 0,722 mmol, 73,1 mg, 100,76 μl) y posteriormente cloroformiato de fenilo (1,2 eq., 0,722 mmol, 112,6 mg, 90,25 μl) y la mezcla se dejó agitar durante 20 horas. Se añadió agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna (100 % DCM) para proporcionar un sólido blanco transparente (190,8 mg, 0,517 mmol, 85,9 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (d, *J* = 7,6, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,49 (dd, *J* = 8,0, 1,1, 1H), 7,46 - 7,40 (m, 2H), 7,33 (d, *J* = 1,0, 1H), 7,29 - 7,20 (m, 3H), 3,99 (s, 3H), 1,38 (s, 12H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 151,36 (C), 150,61 (C), 146,98 (C), 129,97 (C), 129,41 (2x CH), 128,61 (CH), 125,68 (CH), 125,05 (C), 121,74 (2x CH), 117,30 (CH), 115,41 (CH), 83,80 (2x C), 55,96 (CH₃), 24,92 (4x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 370,5, 392,5 (+Na).

N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]-3,3-dimetilbutanamida:



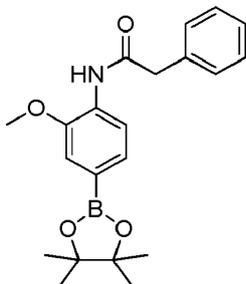
5 A una disolución de ácido 4-amino-3-metoxibencenoborónico, éster de pinacol (150 mg, 0,602 mmol) en DCM (2 ml) se agregó trietilamina (1,2 ml, 0,722 mmol, 73,1 mg, 100,76 μ l) y posteriormente cloruro de t-butilacetil (1,2 eq., 0,722 mmol, 96,8 mg, 99,9 μ l) y la mezcla se dejó agitar durante 20 horas. Se añadió agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-3 %) para proporcionar un sólido marrón (195,7 mg, 0,564 mmol, 93,6 %). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,44 (d, $J = 8,0$, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,47 (dd, $J = 8,0$, 1,0, 1H), 7,32 - 7,29 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 2,31 - 2,27 (m, 2H), 1,36 (s, 12H), 1,13 (s, 9H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170,06 (C), 169,99 (C), 146,89 (C), 130,52 (C), 128,54 (CH), 118,61 (CH), 115,22 (CH), 83,75 (2x C), 55,86 (CH₃), 52,08 (CH₂), 31,22 (C), 29,81 (3x CH₃), 24,86 (4x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 348,6, 370,6 (+Na).

N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]-3-fenil-propanamida:



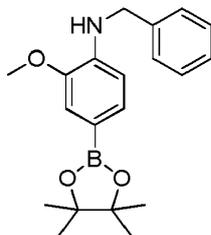
15 A una disolución de ácido 4-amino-3-metoxibencenoborónico, éster de pinacol (150 mg, 0,602 mmol) en DCM (2 ml) se agregó trietilamina (1,2 eq., 0,722 mmol, 73,1 mg, 100,76 μ l) y posteriormente cloruro de hidrocinaoilo (1,2 eq., 0,722 mmol, 121,3 mg, 106,9 μ l) y la mezcla se dejó agitar durante 23 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-2 %) para proporcionar un sólido marrón (240,0 mg, 0,629 mmol, 100 %). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,44 (d, $J = 8,0$, 1 H), 7,83 (s, 1H), 7,47 (d, $J = 8,0$, 1H), 7,35 - 7,30 (m, 2H), 7,28 - 7,21 (m, 4H), 3,90 (s, 3H), 3,14 - 3,04 (m, 2H), 2,79 - 2,72 (m, 2H), 1,37 (s, 12H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170,25 (C), 170,17 (C), 146,82 (C), 140,70 (C), 130,40 (C), 128,56 (CH), 128,52 (CH), 128,40 (CH), 126,34 (CH), 118,68 (CH), 115,21 (CH), 83,78 (2x C), 55,84 (CH₃), 39,72 (CH₂), 31,42 (CH₂), 24,87 (4x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 382,7, 390,6 (+Na)

N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]-2-fenil-acetamida:



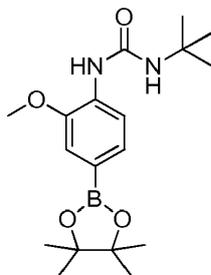
25 A una disolución de ácido 4-amino-3-metoxibencenoborónico, éster de pinacol (150 mg, 0,602 mmol) en DCM (2 ml) se agregó trietilamina (1,2 eq., 0,722 mmol, 73,1 mg, 100,76 μ l) y posteriormente cloruro de fenilacetilo (1,2 eq., 0,722 mmol, 111,2 mg, 95,1 μ l) y la mezcla se dejó agitar durante 18 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-1,5 %) para proporcionar un sólido crema (200,9 mg, 0,547 mmol, 90,9 %). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,40 (d, $J = 8,0$, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,43 (ddd, $J = 11,3$, 6,6, 1,6, 3H), 7,39 - 7,33 (m, 3H), 7,22 (d, $J = 1,0$, 1H), 3,78 (s, 5H), 1,35 (s, 12H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168,92 (C), 168,84 (C), 147,04 (C), 134,50 (C), 130,31 (C), 129,61 (2x CH), 129,05 (2x CH), 128,51 (CH), 127,47 (CH), 118,43 (CH), 115,31 (CH), 83,76 (C), 55,88 (CH₃), 45,24 (CH₂), 24,86 (4x CH₃); MS (ES +ve) [M+H]⁺: 368,7, 390,6 (+Na)

N-bencil-2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina:



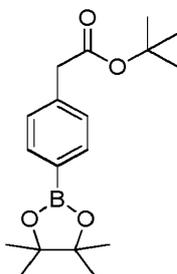
5 A una disolución de ácido 4-amino-3-metoxibencenoborónico, éster de pinacol (150 mg, 0,602 mmol) en DCM (2 ml) se agregó trietilamina (1,2 eq., 0,722 mmol, 73,1 mg, 100,76 μ l) y posteriormente cloroformiato de bencilo (1,2 eq., 0,722 mmol, 123,2 mg, 103,07 μ l) y la mezcla se dejó agitar durante 18 horas. El producto se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna (100 % DCM), para proporcionar un aceite espeso marrón claro (65,9 mg, 0,172 mmol, 28,6 %). Solo después de la caracterización se descubrió que el producto alquilado (mostrado) se había producido en cambio. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7,43 - 7,26 (m, 8H), 6,68 (d, $J = 7,6$, 1H), 4,41 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 1,35 (s, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, MeOD) δ 158,39 (C), 146,09 (C), 141,18 (C), 139,78 (C), 128,82 (CH), 128,08 (CH), 126,76 (CH), 126,52 (CH), 114,34 (CH), 108,93 (CH), 83,13 (CH_2), 54,55 (CH_3), 46,58 (C), 23,73 (4x CH_3); MS (ES +ve)[M+H] $^+$: 340,6.

1-tert-butil-3-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]urea:



15 A una disolución de ácido 4-amino-3-metoxibencenoborónico, éster de pinacol (150 mg, 0,602 mmol) en DCM (3 ml) se agregó t-butilisocianato (20 eq., 12,04 mmol, 1,19 g) y la mezcla se dejó en agitación a las 72 horas. Se añadieron DCM y agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-2 %) para proporcionar un sólido marrón oscuro (40,9 mg, 0,117 mmol, 19,5 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8,09 (d, $J = 8,0$, 1H), 7,44 (dd, $J = 8,0$, 1,2, 1H), 7,27 (d, $J = 1,0$, 1H), 6,88 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,37 (d, $J = 3,9$, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 153,97 (C), 146,81 (C), 131,78 (C), 128,70 (CH), 117,77 (CH), 115,36 (CH), 83,65 (CH), 55,74 (C), 50,97 (CH_3), 29,36 (C), 29,09 (3x CH_3), 24,87 (4x CH_3); MS (ES +ve) [M+H] $^+$: 349,7, 371,6 (+Na)

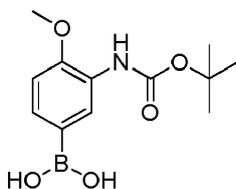
2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de terc-butilo:



25 Se disolvió éster de pinacol de ácido 4-(carboximetil)fenilborónico (150 mg, 0,572 mmol) en 5 ml de tolueno seco. Se añadió cloruro de tionilo (1,2 eq., 0,686 mmol, 81,6 mg, 49,8 μ l) y posteriormente una gota de DMF y la reacción se calentó a reflujo (120 $^\circ\text{C}$) durante 2 horas. La reacción se enfrió hasta t.a. después se añadió alcohol t-butílico (5 eq., 2,86 mmol, 211,8 mg, 0,273 ml) y trietilamina (2,5 eq., 1,43 mmol, 199,3 μ l) y la mezcla se dejó agitar durante 18 horas. Se añadieron agua y DCM a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 y se concentró *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (100 % DCM), para proporcionar un aceite marrón claro (60 mg, 0,189 mmol, 33,0 %). MS (ES +ve) (M+H) $^+$: 340,8 (+Na)

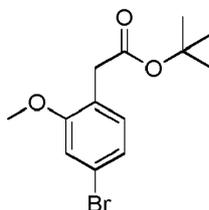
30

Ácido [3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-metoxi-fenil]borónico:



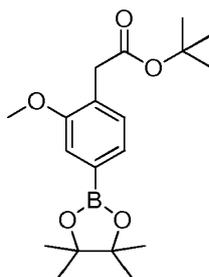
Se suspendió ácido (3-amino-4-metoxifenil)borónico (150 mg, 0,898 mmol) en DCM (5 ml). Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (1,5 eq., 1,347 mmol, 294,0 mg) y posteriormente una pequeña espátula de DMAP y la reacción se dejó agitar durante 18 horas. Se añadió agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-4 %) para proporcionar un sólido marrón oscuro (189,9 mg, 0,711 mmol, 79,2 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,12 (s, 1H), 7,34 (dd, J = 8,2, 1,5, 1H), 6,98 (d, J = 8,2, 1H), 3,88 (s, J = 4,9, 3H), 1,53 (s, 9 HORAS); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 153,77 (C), 150,52 (C), 129,82 (CH), 129,49 (CH), 126,76 (C), 125,18 (C), 109,48 (CH), 79,78 (C), 54,74 (CH₃), 27,26 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 268,5.

2-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) fenil]acetato de terc-butilo:



Se disolvió ácido 2-(4-bromo-2-metoxifenil)acético (2 g, 8,198 mmol) en 20 ml de THF seco. Se añadió cloruro de tionilo (1,2 eq., 9,837 mmol, 1,17 g, 0,714 ml) y posteriormente una gota de DMF y la reacción se calentó a reflujo (80 °C) durante 2 horas. La reacción se enfrió hasta t.a., después se añadió alcohol t-butílico (5 eq., 40,99 mmol, 3,04 g, 3,92 ml) y trietilamina (2,5 eq., 20,49 mmol, 2,86 ml) y la mezcla se dejó en agitación durante 20 horas. Se añadieron agua y EtOAc a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, EtOAc/Hexano (0-4 %) para proporcionar un líquido naranja claro (694,8 mg, 2,316 mmol, 28,2 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7,10 (s, 1H), 7,07 - 7,02 (m, 2H), 3,81 s, 3H), 3,47 (s, 2H), 1,42 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 171,39 (C), 158,43 (C), 131,77 (CH), 122,99 (C), 122,98 (CH), 121,02 (C), 113,67 (CH), 80,51 (C), 54,84 (CH₃)₃, 36,42 (CH₂), 26,85 (3x CH₃); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 323,2/324,8 (+Na).

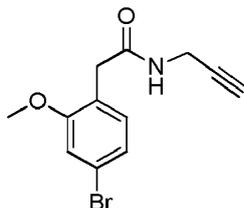
2-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de terc-butilo:



A una disolución de 2-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de terc-butilo (600 mg, 2,0 mmol) en dioxano/agua (18/2 ml) se añadieron bis(pinacolato)diboro (1,5 eq., 762,6 mg, 3,0 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 414,6 mg, 3,0 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 104,9 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles, 22,5 mg) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una hora. La MS mostró un poco de SM, por lo que la mezcla se calentó durante otra hora. La MS y TLC mostraron que la reacción se había completado. Se añadieron EtOAc y agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, EtOAc/Hexano (0-10 %) para proporcionar un aceite incoloro (322,4 mg, 0,926 mmol, 46,3 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,37 (d, J = 8,0, 1H), 7,26 (d, J = 3,0, 1H), 7,18 (d, J = 7,3, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,54 (s, 2H), 1,42 (s, 9H), 1,34 (s, 12H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 170,96 (C), 157,02 (C), 130,25 (CH), 127,29 (C), 127,28 (CH), 115,89 (CH), 109,97 (C), 83,75 (C), 80,34 (C), 55,46 (CH₃), 37,58 (CH₂), 28,03 (3x CH₃), 24,85 (4x CH₃); MS (ES +ve) [M+ H]⁺: 349,7.

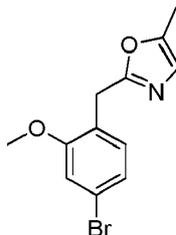
35

2-(4-bromo-2-metoxi-fenil)-N-prop-2-inil-acetamida:



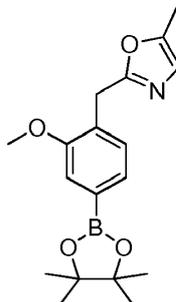
5 Se disolvió ácido 2-(4-bromo-2-metoxifenil)acético (500 mg, 2,049 mmol) se disolvió en 5 ml de tolueno seco. Se añadió cloruro de tionilo (1,2 eq., 2,46 mmol, 292,7 mg, 178,3 μ l) y posteriormente una gota de DMF y la reacción se calentó a reflujo (120 °C) durante 3 horas. La reacción se enfrió hasta t.a. después se agregó propargilamina (2,5 eq., 5,12 mmol, 282,2 mg, 0,328 ml) y trietilamina (2,5 eq., 5,12 mmol, 0,714 ml) y la reacción se dejó agitar durante 20 horas. Se añadieron DCM y agua a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-3 %) para proporcionar un sólido de color crema (458,2 mg, 1,631 mmol, 79,6 %). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,13 - 7,07 (m, 2H), 7,04 (s, 1H), 5,78 (s, 1H), 3,99 (dd, $J = 5,2, 2,6, 2H$), 3,86 (s, 3H), 3,51 (s, 2H), 2,21 - 2,16 (m, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 170,11 (C), 157,79 (C), 132,32 (CH), 124,16 (CH), 122,35 (C), 122,07 (C), 114,50 (CH), 79,53 (C), 71,45 (CH), 55,85 (CH_3), 38,02 (CH_2), 29,23 (CH_2); MS (ES +ve) (M+H) $^+$: 281,6/283,6, 303,8/306,0 (+Na)

2-[(4-bromo-2-metoxi-fenil)metil]-5-metil-oxazol:



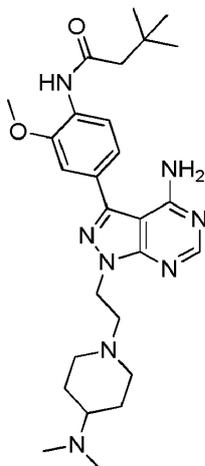
15 Se disolvió 2-(4-bromo-2-metoxi-fenil)-N-prop-2-inil-acetamida (200 mg, 0,713 mmol) en 2 ml de 1,2-dicloroetano en un vial de microondas. Se agregó $FeCl_3$ (0,5 eq., 57,6 mg, 0,356 mmol) y la mezcla se calentó hasta 150 °C durante 90 minutos. Se añadieron agua y DCM a la mezcla y la capa orgánica se separó, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (1 %), para proporcionar un aceite amarillo claro/naranja (108,7 mg, 0,389 mmol, 54,3 %). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,09 - 7,03 (m, 2H), 7,01 (s, 1H), 6,65 (d, $J = 1,1, 1H$), 4,04 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 2,26 (d, $J = 1,2, 3H$); ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 161,66 (C), 157,87 (C), 148,90 (C), 131,42 (CH), 123,66 (CH), 123,09 (C), 122,03 (CH), 121,65 (C), 114,31 (CH), 55,83 (CH_3), 28,30 (CH_2), 10,88 (CH_3); MS (ES +ve) (M+H) $^+$: 281,6/283,6, 303,8/306,0 (+Na).

2-[[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]metil]-5-metil-oxazol:



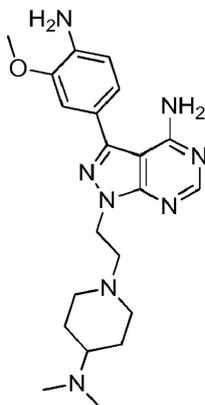
25 A una disolución de 2-[(4-bromo-2-metoxi-fenil)metil]-5-metil-oxazol (80 mg, 0,285 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron bis(pinacolato)diboro (1,5 eq., 108,5 mg, 0,427 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 59,0 mg, 0,427 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 15,0 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, EtOAc/hexano (30-40%) para proporcionar un aceite transparente (37,0 mg, 0,1124 mmol, 39,4 %). 1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7,35 - 7,30 (m, 1H), 7,20 - 7,12 (m, 1H), 6,69 - 6,65 (m, 1H), 5,97 (s, 1H), 4,51 (s, 2H), 4,08 (s, 3H), 2,28 (s, 3H), 1,37 (s, 12H); MS (ES +ve) (M+H) $^+$: 329,18

N-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]-3,3-dimetil-butanamida (526):



5 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/ agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]-3,3-dimetilbutanamida (1,5 eq., 63,1 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. El producto se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 % y después 0-30 gotas de trietilamina por 100 ml) para proporcionar un sólido de color arena (34,3 mg, 0,0675 mmol, 56,0 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,28 (s, 1H), 8,10 (d, *J* = 8,1, 1H), 7,35 (d, *J* = 1,8, 1H), 7,28 (dd, *J* = 8,1, 1,8, 1H), 4,57 (t, *J* = 6,7, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,15 (m, 2H), 2,95 (t, *J* = 6,7, 2H), 2,39 (m, 9H), 2,15 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,91 (d, *J* = 16,8, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,14 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 172,20 (C), 158,53 (C), 155,44 (CH), 154,22 (C), 151,00 (C), 144,89 (C), 129,52 (C), 127,69 (C), 123,12 (CH), 120,22 (CH), 110,74 (CH), 97,79 (C), 62,24 (CH), 56,24 (CH₂), 55,08 (CH₃), 52,23 (2x CH₂), 49,79 (CH₂), 44,04 (CH₂), 40,11 (2x CH₃), 30,67 (C), 28,81 (3x CH₃), 27,31 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 509,6; HRMS (ES +ve), C₂₇H₄₁N₈O₂[M+H]⁺: calculado 509,33470, encontrado 509,3363.

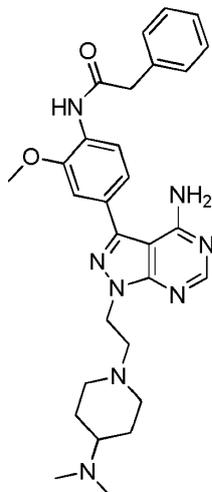
3-(4-amino-3-metoxi-fenil)-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (532):



20 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/ agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]carbamato de fenilo (1,5 eq., 66,8 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C por 30 minutos. La mezcla se concentró al vacío y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón (19,4 mg, 0,0473 mmol, 39,2 %). ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8,25 (s, 1H), 7,16 (d, *J* = 1,8, 1H), 7,09 (dd, *J* = 7,9, 1,8, 1H), 6,91 (d, *J* = 7,9, 1H), 4,54 (t, *J* = 6,7, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,14 (d, *J* = 12,0, 2H), 2,93 (t, *J* = 6,7, 2H), 2,40 (m, 7H), 2,14 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,90 (d, *J* = 12,3, 2H), 1,49 (d, *J* = 12,1, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,62 (C), 155,35 (CH), 153,98 (C), 147,74 (C), 146,01 (C), 138,32 (C), 121,70 (CH), 121,07 (C), 114,69 (CH), 110,25 (CH), 109,97 (C), 62,19 (CH₂), 56,24 (CH₃), 54,74 (2x CH₂), 52,29 (CH), 43,91 (CH₂), 40,14 (2x CH₃), 27,35 (2x CH₂); MS (ES +ve) (M + H)⁺: 411,6; HRMS (ES +ve), C₂₁H₃₁N₈O₁ (M+H)⁺: calculado 411,26208, encontrado 411,26270.

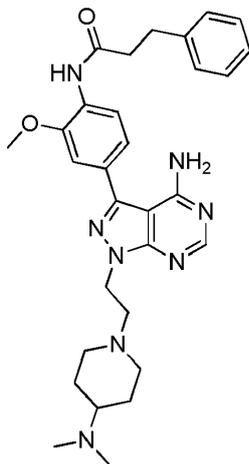
30

N-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]-2-fenil-acetamida (530):



A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3-dioxolan-2-il) fenil]-2-fenil-acetamida (1,5 eq., 66,5 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. El producto se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-30 gotas de trietilamina por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (37,9 mg, 0,0717 mmol, 59,5 %). ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 8,20 (d, *J* = 8,2, 1H), 7,40 (dt, *J* = 15,2, 7,5, 4H), 7,32 (dd, *J* = 11,0, 4,4, 2H), 7,26 (dd, *J* = 8,2, 1,8, 1H), 4,56 (t, *J* = 6,7, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,83 (s, 2H), 3,13 (d, *J* = 11,8, 2H), 2,93 (t, *J* = 6,7, 2H), 2,34 (d, *J* = 13,6, 7H), 2,13 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,88 (d, *J* = 12,7, 2H), 1,47 (dt, *J* = 12,2, 8,6, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 171,20 (C), 158,51 (C), 155,42 (CH), 154,17 (C), 150,35 (C), 144,81 (C), 135,19 (C), 129,30 (C), 128,98 (2x CH), 128,38 (2x CH), 127,83 (C), 126,78 (CH), 122,00 (CH), 120,30 (CH), 110,62 (CH), 97,77 (C), 62,25 (CH), 56,21 (CH₂), 55,12 (CH₃), 52,24 (2x CH₂), 44,05 (CH₂), 43,30 (CH₂), 40,09 (2x CH₃), 27,29 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 529,6; HRMS (ES +ve), C₂₉H₃₇N₈O₂ [M+H]⁺: calculado 529,30340, encontrado 529,3051.

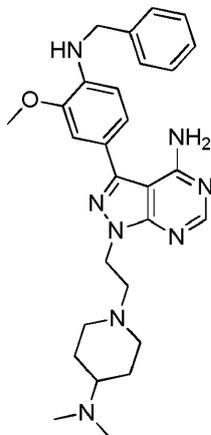
N-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]-3-fenil-propanamida (531):



A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron N-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]-3-fenil-propanamida (1,5 eq., 69,0 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. El producto se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-30 gotas de trietilamina por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (36,0 mg, 0,0664 mmol, 55,1 %). ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 8,13 (d, *J* = 8,1, 1H), 7,27 (d, *J* = 1,7, 5H), 7,26 (dd, *J* = 8,2, 1,8, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,6, 4,4, 1H), 4,57 (t, *J* = 6,7, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,15 (d, *J* = 11,8, 2H), 3,05 (m, 3H), 2,95 (t, *J* = 6,7, 2H), 2,81 (t, *J* = 7,7, 2H), 2,41 (s, 6H), 2,14 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,91 (d, *J* = 17,2, 3H), 1,49 (d, *J* = 8,7, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 172,65 (C), 158,53 (CH), 155,44 (C), 154,18 (C), 150,64 (C), 144,88 (C), 140,73 (C), 129,32 (C), 128,15 (CH), 127,76 (C), 125,85 (CH), 122,70 (CH), 120,20 (CH), 110,65 (CH), 97,77 (CH), 62,38 (C), 56,18 (CH₂), 55,06 (CH₃), 52,14 (2x CH₂), 46,33 (CH₂), 44,04 (CH₂), 39,99 (2x CH₃), 38,18 (CH₂), 31,38 (CH₂), 27,17

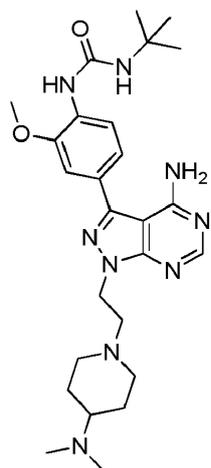
(2x CH₂); MS (ES +ve) [M+H]⁺: 543,6; HRMS (ES +ve), C₃₀H₃₉N₈O₂[M+H]⁺: calculado 543,31905, encontrado 543,3204.

3-[4-(bencilamino)-3-metoxi-fenil]-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (533):



- 5 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron N-bencil-2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (1,5 eq., 61,4 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró al vacío sin y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 %
10 %, después 5-20 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido de color marrón claro (31,8 mg, 0,0584, 48,5 %). ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,24 (s, 1H), 7,40 (d, J = 7,5, 2H), 7,33 (t, J = 7,5, 2H), 7,24 (t, J = 7,3, 1H), 7,15 (d, J = 1,8, 1H), 7,08 (dd, J = 8,1, 1,8, 1H), 6,67 (d, J = 8,1, 1H), 4,52 (t, J = 6,7, 2H), 4,47 (s, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,13 (d, J = 11,9, 2H), 2,92 (t, J = 6,7, 2H), 2,37 (s, 7H), 2,13 (t, J = 11,0, 2H), 1,88 (d, J = 12,3, 2H), 1,47 (d, J = 8,5, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 166,23 (C), 158,62 (C), 155,34 (CH), 153,97 (C), 147,34 (C), 139,75 (C), 139,27 (C), 128,13 (2x CH), 126,78 (2x CH), 126,58 (CH), 121,15 (CH), 119,94 (C), 109,78 (CH), 109,27 (CH), 97,66 (C), 62,17 (CH), 56,20 (CH₂), 54,81 (CH₃), 52,22 (2x CH₂), 46,71 (CH₂), 43,89 (CH₂), 40,08 (2x CH₃), 27,28 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 501,4; HRMS (ES +ve), C₂₈H₃₇N₈O₁[M+H]⁺: calculado 501,30848, encontrado 501,3087.

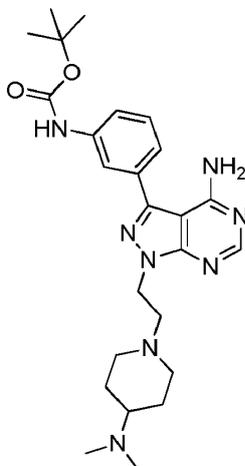
1-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]-3-terc-butil-urea (540):



- 20 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron 1-terc-butil-3-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]urea (1,5 eq., 62,9 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró. *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 %
25 % y después 0-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (30,4 mg, 0,0597 mmol, 49,5 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,24 (s, 1H), 8,16 (d, J = 8,3, 1H), 7,25 (d, J = 1,8, 1H), 7,19 (dd, J = 8,3, 1,9, 1H), 4,53 (t, J = 6,7, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,12 (d, J = 11,9, 2H), 2,92 (t, J = 6,7, 2H), 2,36 (m, 7H), 2,12 (t, J = 11,1, 2H), 1,87 (d, J = 12,5, 2H), 1,51 - 1,42 (m, 2H), 1,38 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 155,74 (C), 155,40 (CH), 154,09 (C), 148,52 (C), 145,33 (C), 130,34 (C), 125,66 (C), 120,49 (CH), 118,66 (CH), 110,02 (CH), 97,73 (C), 62,27 (CH), 56,23 (CH₂), 55,02 (CH₃), 52,22 (2x CH₂), 49,71 (C), 43,97 (CH₂), 40,07 (2x CH₃), 28,15 (3x CH₃), 27,20 (2x CH₂); MS (ES

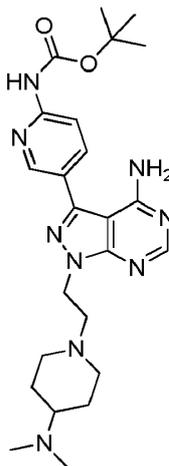
+ve)[M+H]⁺: 510,8; HRMS (ES +ve), C₂₆H₄₀N₉O₂ (M + H)⁺: calculado 510,32995, encontrado 510,32830.

N-[3-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenil]carbamato de terc-butilo (542):



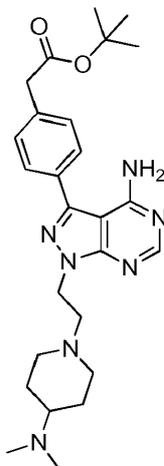
5 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron ácido 3-(boc-amino)benzenoborónico (1,5 eq., 42,9 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido crema (28,0 mg, 0,0583 mmol, 48,4 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H),
 10 7,88 (s, 1H), 7,50 - 7,44 (m, 2H), 7,37 (d, *J* = 7,0, 1H), 4,57 (t, *J* = 6,7, 2H), 3,16 - 3,10 (m, 2H), 2,95 (t, *J* = 6,7, 2H), 2,35 (m, 7H), 2,14 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,88 (d, *J* = 12,7, 2H), 1,56 (s, 9H), 1,47 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,42 (C), 155,37 (CH), 154,22 (C), 154,00 (C), 144,97 (C), 140,14 (C), 133,30 (C), 129,46 (CH), 122,27 (CH), 119,16 (CH), 118,54 (CH), 97,74 (C), 79,72 (C), 62,16 (CH), 56,21 (CH₂), 52,29 (2x CH₂), 44,06 (CH₂), 40,16 (2x CH₃), 27,38 (2x CH₂), 27,28 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 481,4; HRMS (ES +ve), C₂₅H₃₇N₈O₂[M+H]⁺: calculado 480,30340,
 15 encontrado 481,3054.

N-[5-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-piridil]carbamato de terc-butilo (549):



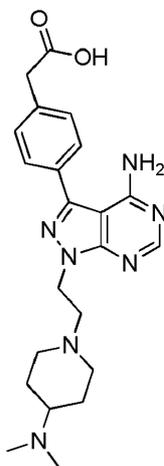
20 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron ácido 6-((terc-butoxicarbonil)amino)piridin-3-il)borónico (1,5 eq., 43,1 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % después 10-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido blanco (23,8 mg, 0,0495 mmol, 41,0 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,55 - 8,51 (m, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,06 - 8,01 (m, 2H), 4,55 (t, *J* = 6,5, 2H), 3,14 (d, *J* = 12,0, 2H), 2,94 (t, *J* = 6,5, 2H), 2,68 (m, 1H), 2,55 (s, 6H), 2,14 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,92 (d, *J* = 12,7, 2H), 1,55 (s, 9H), 1,53 - 1,46 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,58 (C), 155,47 (CH), 154,40 (C), 153,05 (C), 152,96 (C), 147,13 (CH), 141,83 (C),
 25 137,78 (CH), 123,46 (C), 112,28 (CH), 97,92 (C), 80,49 (C), 62,79 (CH), 56,00 (CH₂), 51,78 (2x CH₂), 44,12 (CH₂), 39,64 (2x CH₃), 27,16 (3x CH₃), 26,76 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 481,8; HRMS (ES +ve), C₂₄H₃₆N₉O₂[M+H]⁺: calculado 482,29865, encontrado 482,3004.

2-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenil]acetato de terc-butilo (553):



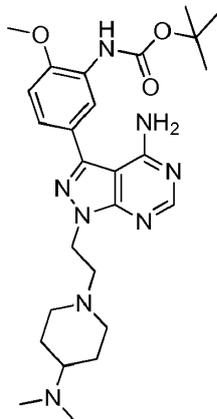
5 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron 2-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de terc-butilo (1,5 eq., 57,6 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 °C minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un aceite espeso marrón claro (40,5 mg, 0,0845 mmol, 70,1 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,26 (s, 1H), 7,68 - 7,63 (m, 2H), 7,47 (d, *J* = 8,2, 2H), 4,55 (t, *J* = 6,6, 2H), 3,68 (s, 2H), 3,12 (d, *J* = 11,9, 2H), 2,93 (t, *J* = 6,6, 2H), 2,43 (m, 7H), 2,13 (t, *J* = 11,0, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,47 (m, 11H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 171,52 (C), 158,52 (C), 155,44 (CH), 154,21 (C), 144,85 (C), 136,00 (C), 131,41 (C), 129,95 (2x CH), 128,45 (2x CH), 97,81 (C), 81,01 (C), 62,40 (CH), 56,15 (CH₂), 52,10 (2x CH₂), 44,04 (CH₂), 41,58 (CH₂), 39,95 (2x CH₃), 27,13 (2x CH₂), 26,88 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 480,0; HRMS (ES +ve), C₂₆H₃₈N₇O₂[M+H]⁺: calculado 480,30815, encontrado 480,3121.

15 Ácido 2-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenil]acético (556):



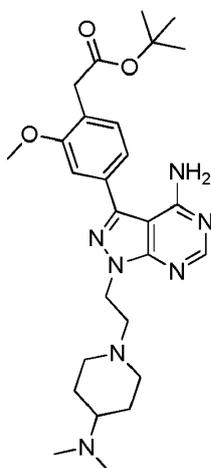
20 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron éster de pinacol de ácido 4-(carboximetil)fenilborónico (1,5 eq., 47,4 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % después 0-50 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido crema, (25,0 mg, 0,0591 mmol, 49,0 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,26 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,2, 2H), 7,49 (d, *J* = 8,2, 2H), 4,55 (t, *J* = 6,3, 2H), 3,62 (s, 2H), 3,20 - 3,15 (m, 2H), 2,98 (t, *J* = 6,3, 3H), 2,74 (s, 6H), 2,18 (t, *J* = 11,0, 2H), 2,03 - 1,96 (m, 2H), 1,56 (dd, *J* = 12,1, 3,9, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 177,81 (C), 158,57 (C), 155,42 (CH), 154,16 (C), 145,31 (C), 139,11 (C), 130,29 (C), 129,88 (2x CH), 128,10 (2x CH), 97,82 (C), 63,29 (CH₂), 55,78 (CH₂), 51,37 (2x CH₂), 44,08 (CH₂), 39,26 (2x CH₃), 29,53 (CH), 26,34 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 424,4; HRMS (ES +ve), C₂₂H₃₀N₇O₂[M+H]⁺: calculado 424,24555, encontrado 424,2475.

N-[5-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (559):



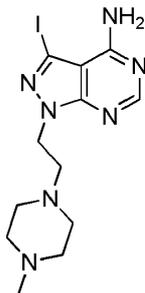
A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron ácido [3-(terc-butoxicarbonilamino)-4-metoxi-fenil] borónico (1,5 eq., 48,4 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 % después 0-20 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido marrón claro (32,9 mg, 0,0645 mmol, 53,5 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8.26 (d, J = 5.2, 1H), 8.19 (d, J = 2.1, 1H), 7.41 (dd, J = 8.4, 2.2, 1H), 7.19 (d, J = 8.5, 1H), 4.56 (t, J = 6.6, 2H), 3.99 (d, J = 5.1, 3H), 3.15 (d, J = 12.1, 2H), 2.96 (t, J = 6.6, 2H), 2.54 (m, 1H), 2.48 (s, 6H), 2.16 (t, J = 10.9, 2H), 1.92 (d, J = 10.5, 2H), 1.56 (d, J = 5.1, 9H), 1.55 - 1.46 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158.48 (C), 155.35 (CH), 154.20 (C), 153.82 (C), 149.93 (C), 145.03 (C), 128.25 (C), 124.95 (C), 123.27 (CH), 119.69 (CH), 111.00 (CH), 97.67 (C), 80.15 (C), 62.52 (CH), 56.07 (CH₂), 55.11 (CH₃), 51.99 (2x CH₂), 44.01 (CH₂), 39.86 (2x CH₃), 27.22 (3x CH₃), 27.03 (2x CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 511.4; HRMS (ES +ve), C₂₆H₃₉N₈O₃[M+H]⁺: calculado 511.31396, encontrado 511.3166.

2-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]acetato de terc-butilo (565):



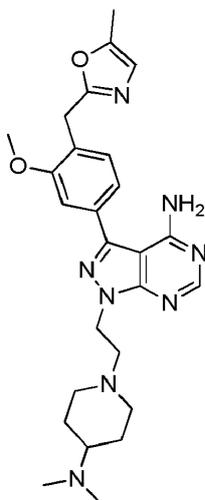
A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (34,7 mg, 0,0836 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron 2-[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de terc-butilo (1 eq., 29,1 mg, 0,0836 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 17,3 mg, 0,125 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 4,4 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120°C. °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 % después 0-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido crema (19 mg, 0,0373 mmol, 44,6 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,26 (s, 1H), 7,35 (d, J = 7,6, 1H), 7,26 (d, J = 1,4, 1H), 7,22 (dd, J = 7,5, 1,6, 1H), 4,56 (t, J = 6,7, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,64 (s, 2H), 3,13 (d, J = 11,9, 2H), 2,94 (t, J = 6,7, 2H), 2,37 (m, 7H), 2,13 (t, J = 11,0, 2H), 1,91 - 1,85 (m, 2H), 1,48 (m, 11H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 172,07 (C), 158,55 (C), 158,18 (C), 155,46 (CH), 154,14 (C), 145,09 (C), 133,02 (C), 131,48 (CH), 124,76 (C), 120,21 (CH), 110,45 (CH), 97,82 (C), 80,76 (C), 62,26 (CH), 56,22 (CH₂), 54,70 (CH₃), 52,24 (2x CH₂), 44,04 (CH₂), 40,09 (2x CH₃), 36,61 (CH₂), 27,28 (2x CH₂), 26,90 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 510,2; HRMS (ES +ve), C₂₇H₄₀N₇O₃[M+H]⁺: calculado 510,31872, encontrado 510,3185.

3-yodo-1-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



Se añadieron 100 mg, 0,265 mmol de 1-(2,2-dietoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 5 ml. Después se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó hasta 100°C durante 30 minutos en el microondas. Los disolventes fueron removidos *in vacuo* para proporcionar un aceite marrón oscuro. Se suspendieron 0,265 mmol de 2-(4-amino-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió 1-metilpiperizina (1,5 eq., 0,399 mmol, 39,8 mg, 44,1 μ l) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,399 mmol, 84,6 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 17 horas durante la noche. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 % después 0-15 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un aceite espeso de color naranja claro (89,1 mg, 0,2302 mmol, 86,9 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,22 (s, 1H), 4,51 (t, J = 6,0, 2H), 3,33 (d, J = 1,7, 4H), 3,20 - 3,04 (m, 4H), 2,98 (t, J = 6,0, 2H), 2,83 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,05 (C), 155,67 (CH), 153,80 (C), 103,55 (C), 87,02 (C), 55,51 (CH₂), 53,44 (CH₂), 49,45 (CH₂), 44,18 (CH₂), 43,07 (CH₂), 42,03 (CH₃); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 388,4.

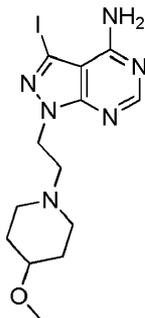
15 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-[3-metoxi-4-[(5-metiloxazol-2-il)metil]fenil]pirazolo[3,4-d]pirimidina-4-amina (584):



A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/ agua (4,5/0,5 ml) se añadieron 2 -[[2-metoxi-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]metil]-5-metiloxazol (1 eq., 39,7 mg, 0,1205 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (10 % y después 0-30 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido amarillo pálido (36,8 mg, 0,0751 mmol, 62,3 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,28 (s, 1H), 7,38 (d, J = 7,6, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,26 (dd, J = 7,6, 1,6, 1H), 6,69 (d, J = 1,2, 1H), 4,57 (t, J = 6,6, 2H), 4,15 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,17 (d, J = 7,4, 2H), 2,96 (t, J = 6,6, 2H), 2,69 (m, 1H), 2,56 (s, 6H), 2,31 (s, 3H), 2,17 (t, J = 11,0, 2H), 1,94 (m, 2H), 1,54 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 162,54 (C), 158,55 (C), 157,95 (C), 155,47 (CH), 154,21 (C), 149,33 (C), 145,01 (C), 133,18 (C), 130,96 (CH), 124,85 (C), 121,56 (CH), 120,34 (CH), 110,70 (CH), 97,78 (C), 62,77 (CH), 56,03 (CH₂), 54,78 (CH₃), 51,82 (2x CH₂), 44,08 (CH₂), 39,66 (2x CH₃), 28,17 (CH₂), 26,79 (2x CH₂), 9,16 (CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 491,8; HRMS (ES +ve), C₂₆H₃₅N₈O₂[M+H]⁺: calculado 491,28775, encontrado 491,2862.

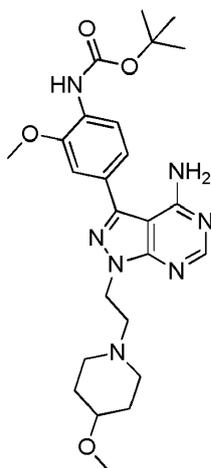
30

3-yodo-1-[2-(4-metoxi-1-piperidil)etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



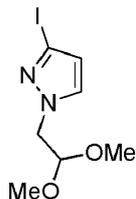
Se añadieron 100 mg, 0,287 mmol de 1-(2,2-dimetoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 5 ml. La mezcla se concentró después *in vacuo*. Se suspendieron 0,287 mmol de 2-(4-amino-3-yodopirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió 4-metoxipiperidina (1,5 eq., 0,430 mmol, 49,5 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Después se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,430 mmol, 91,1 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 72 horas. El producto se concentró *in vacuo* y el producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-8 %) para proporcionar un sólido amarillo pálido (112 mg, 0,279 mmol, 97,1 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,23 (s, 1H), 4,53 (t, J = 6,6, 2H), 3,29 (s, 1H), 2,98 (t, J = 6,5, 2H), 2,91 (s, 2H), 2,45 (s, 2H), 1,89 (s, 2H), 1,57 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,09 (C), 155,71 (CH), 153,68 (C), 103,71 (C), 87,16 (C), 75,13 (CH), 56,19 (CH₂), 54,43 (CH₃), 50,24 (2x CH₂), 43,96 (CH₂), 29,68 (2x CH₂); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 403,0.

N-[4-[4-amino-1-[2-(4-metoxi-1-piperidil)etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (593):



A una disolución de 3-yodo-1-[2-(4-metoxi-1-piperidil)etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,124 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 49,8 mg, 0,187 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,8 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 6,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-10 %) para proporcionar un sólido de color crema (60,0 mg, 0,121 mmol, 97,3 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,29 (s, 1H), 8,08 (d, J = 8,2, 1H), 7,31 (d, J = 1,8, 1H), 7,27 (dd, J = 8,2, 1,8, 1H), 4,63 (t, J = 6,6, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,12 (m, 2H), 3,02 (m, 2H), 2,60 (m, 2H), 1,93 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,57 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,53 (C), 155,46 (CH), 154,22 (C), 153,42 (C), 149,28 (C), 145,17 (C), 128,73 (C), 127,38 (C), 120,44 (CH), 119,50 (CH), 110,33 (CH), 97,94 (C), 80,15 (C), 75,12 (CH), 56,21 (CH₂), 55,10 (CH₃), 54,79 (CH₃), 50,02 (2x CH₂), 43,60 (CH₂), 29,69 (2x CH₂), 27,21 (3x CH₃); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 498,2; HRMS (ES +ve), C₂₅H₃₅N₇O₄[M+H]⁺: calculado 498,28233, encontrado 498,2850.

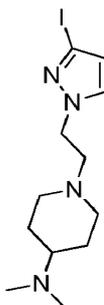
1-(2,2-dimetoxietil)-3-yodo-pirazol:



5 A una disolución de 3-yodo-1H-pirazol (500 mg, 2,578 mmol) en DMF (10 ml) se añadió hidruro de sodio (1,5 eq., 3,867 mmol, dispersión al 60 % en aceite mineral, 154,7 mg) y la suspensión se dejó agitar durante 30 minutos hasta que la evolución del gas haya disminuido. Después se añadió gota a gota bromoacetaldehído dimetil acetal (1,5 eq. 3,867 mmol, 649,6 mg, 0,454 ml) y la mezcla se calentó a 150°C en el microondas durante una hora. La mezcla se concentró *in vacuo* para eliminar la mayor cantidad posible de DMF. Después se añadieron EtOAc y agua a la mezcla y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se lavó dos veces con EtOAc y las fracciones orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron *in vacuo*. El producto se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (0-1 %) para proporcionar un sólido naranja claro (519,2 mg, 1,841 mmol, 71,4 %). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (d, *J* = 2,3, 1H), 6,40 (d, *J* = 2,3, 1H), 4,62 (t, *J* = 5,4, 1H), 4,20 (d, *J* = 5,4, 2H), 3,37 (d, *J* = 2,4, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 132,61 (CH), 114,84 (CH), 103,29 (CH₂), 94,49 (C), 55,20 (2x CH₃), 54,55 (CH); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 304,6 (+ Na).

10

1-[2-(3-yodopirazol-1-il)etil]-N,N-dimetil-piperidin-4-amina:

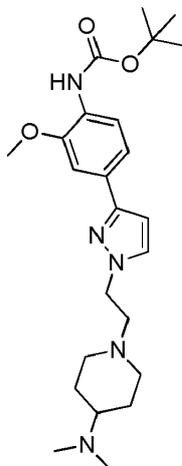


15 Se agregó 1-(2,2-dimetoxietil)-3-yodo-pirazol (250 mg, 0,887 mmol) a un vial de microondas y posteriormente agua (0,25 ml) y TFA (0,25 ml) y la mezcla se calentó hasta 100 °C en el microondas durante una hora. El producto se concentró *in vacuo* y se usó sin purificación adicional. Se suspendieron 0,887 mmol de 2-(3-yodopirazol-1-il)acetaldehído en 5 ml de DCM. Se añadió N,N-dimetilpiperidina-4-amina (1,5 eq., 1,33 mmol, 170,5 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 1,33 mmol, 281,9 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 72 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 % después 10-20 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un aceite naranja claro espeso (306,3 mg, 0,880 mmol, 99,2 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7,54 (d, *J* = 2,3, 1H), 6,43 (d, *J* = 2,3, 1H), 4,27 (t, *J* = 6,4, 2H), 3,10 - 3,05 (m, 1H), 3,05 - 2,99 (m, 2H), 2,85 - 2,76 (m, 8H), 2,17 (td, *J* = 12,0, 2,3, 2H), 2,01 (d, *J* = 13,2, 2H), 1,67 (tt, *J* = 12,1, 6,1, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 132,70 (CH), 114,34 (CH), 93,40 (C), 63,39 (CH), 56,57 (CH₂), 51,40 (2x CH₂), 49,59 (CH₂), 39,17 (2xCH₂), 26,24 (CH₂); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 348,8.

20

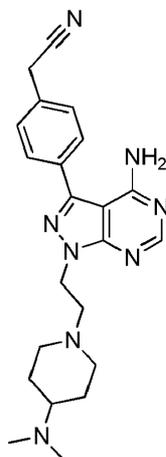
25

N-[4-[1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazol-3-il]-2-metoxifenil]carbamato de terc-butilo (597):



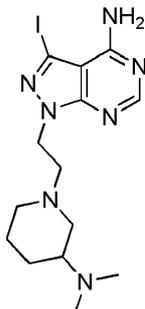
5 A una disolución de 1-[2-(3-yodopirazol-1-il)etil]-N,N-dimetil-piperidin-4-amina (50 mg, 0,1436 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 57,6 mg, 0,215 mmol),
 10 carbonato de potasio (1,5 eq., 29,7 mg, 0,215 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles), 7,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante una hora. La reacción se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 %) para proporcionar un sólido naranja oscuro (42,7 mg, 0,0963 mmol, 67,1 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7,88 (s, 1H), 7,69 (d, *J* = 2,3, 1H), 7,42 (d, *J* = 1,7, 1H), 7,33 (dd, *J* = 8,3, 1,8, 1H), 6,62 (d, *J* = 2,3, 1H), 4,33 (t, *J* = 6,4, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,22 - 3,15 (m, 1H), 3,11 (s, 2H), 2,94 (s, 2H), 2,85 (d, *J* = 14,6, 6H), 2,26 (s, 2H), 2,05 (s, 2H), 1,73 (d, *J* = 8,3, 2H), 1,55 (d, *J* = 4,2, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 153,56 (C), 151,55 (C), 149,10 (C), 131,77 (CH), 128,50 (C), 127,36 (C), 123,00 (C), 119,24 (CH), 117,75 (CH), 107,31 (CH), 102,25 (CH), 63,48 (CH), 56,69 (CH₂), 54,95 (CH₃), 51,21 (2x CH₂), 49,11 (CH₂), 39,19 (2x CH₃), 27,23 (3x CH₃), 26,22 (2x CH₂); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 444,2; HRMS (ES +ve), C₂₄H₃₈N₅O₃ (M+H)⁺: calculado 444,29692, encontrado 444,29650.

15 2-[4-[4-amino-1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]fenil]acetoneitrilo (5-100):



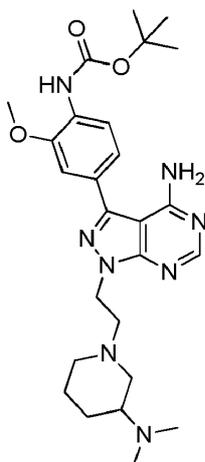
20 A una disolución de 1-[2-[4-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5/0,5 ml) se añadieron ácido 4-(cianometil)bencenoborónico (1 eq., 29,1 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifenilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 % y después 20 gotas de NEt₃ por 100 ml) para proporcionar un sólido crema (41,8 mg, 0,1034 mmol, 85,8 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,27 (s, 1H), 7,79 - 7,70 (m, 2H), 7,59 (d, *J* = 8,3, 2H), 4,56 (t, *J* = 6,4, 2H), 4,03 (s, 2H), 3,18 (d, *J* = 5,8, 2H), 3,04-2,93 (m, 3H), 2,74 (s, 6H), 2,17 (dd, *J* = 15,1, 6,9, 2H), 1,99 (d, *J* = 12,8, 2H), 1,61 - 1,51 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,49 (C), 155,47 (CH), 154,36 (C), 144,35 (C), 132,22 (C), 128,84 (2x CH), 128,70 (2x CH), 117,95 (C), 110,00 (C), 97,74 (C), 63,27 (CH), 55,84 (CH₂), 51,39 (2x CH₂), 44,11 (CH₂), 39,27 (2x CH₃), 26,32 (2x CH₂), 21,98 (CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 405,0; HRMS (ES +ve), C₂₂H₂₉N₈ (M+H)⁺: calculado 405,25097, encontrado 405,24950.

1-[2-[3-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:



5 Se añadieron 100 mg, 0,287 mmol de 1-(2,2-dimetoxietil)-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina a un tubo de microondas de 5 ml. Después se añadieron 2,5 ml de agua y 2,5 ml de TFA y la mezcla se calentó a 100 °C durante 30 minutos en el microondas. El producto se concentró después *in vacuo*. Se suspendieron 0,287 mmol de 2-(4-amino-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)acetaldehído en 3 ml de DCM. Se añadió 3-dimetilaminopiperidina (1,5 eq., 0,430 mmol, 55,1 mg) y posteriormente una gota de ácido acético y la mezcla se dejó agitar durante 10 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (1,5 eq., 0,430 mmol, 91,1 mg) y la mezcla se dejó agitar durante 18 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 %) para proporcionar un sólido crema (117,5 mg, 0,283 mmol, 98,6 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,22 (s, 1H), 4,54 - 4,43 (m, 2H), 3,08 (m, 1H), 2,99 - 2,90 (m, 3H), 2,84 (s, 6H), 2,65 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 1,75 - 1,65 (m, 2H), 1,55 - 1,47 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,13 (C), 155,80 (CH), 153,62 (C), 103,65 (C), 87,01 (C), 62,48 (CH), 56,37 (CH₂), 52,78 (CH₂), 52,75 (CH₂), 44,50 (CH₂), 40,40 (2x CH₃), 24,67 (CH₂), 21,95 (CH₂); MS (ES +ve) (M+H)⁺: 415,8

N-[4-[4-amino-1-[2-[3-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il]-2-metoxi-fenil]carbamato de terc-butilo (5-103):



15 A una disolución de 1-[2-[3-(dimetilamino)-1-piperidil]etil]-3-yodo-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50 mg, 0,1205 mmol) en dioxano/agua (4,5 ml/0,5 ml) se añadieron ácido[4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-metoxi-fenil]borónico (1,5 eq., 48,3 mg, 0,181 mmol), carbonato de potasio (1,5 eq., 25,0 mg, 0,181 mmol) y trifetilfosfina (20 % en moles, 9,5 mg) y posteriormente acetato de paladio (5 % en moles) y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 30 minutos. La mezcla se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía en columna, MeOH/DCM (5-10 %) para proporcionar un sólido rojo oscuro (60,5 mg, 0,119 mmol, 98,4 %). ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,25 (s, 1H), 8,05 (d, J = 8,2, 1H), 7,26 (d, J = 1,8, 1H), 7,22 (dd, J = 8,2, 1,8, 1H), 4,58 - 4,48 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,13 (m, 1H), 2,97 (m, 3H), 2,82 (s, 6H), 2,66 (m, 2H), 2,42 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,71 (m, 2H), 1,52 (m, 10H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 158,61 (C), 155,59 (CH), 154,11 (C), 153,49 (C), 149,33 (C), 145,10 (C), 128,93 (C), 127,24 (C), 120,44 (CH), 119,66 (CH), 110,28 (CH), 97,76 (C), 80,24 (C), 62,58 (CH), 56,39 (CH₂), 55,12 (CH₃), 52,86 (CH₂), 52,73 (CH₂), 44,28 (CH₂), 40,32 (2x CH₃), 27,20 (3x CH₃), 24,59 (CH₂), 21,84 (CH₂); MS (ES +ve)[M+H]⁺: 511,0; HRMS (ES +ve), C₂₆H₃₉N₈O₃ (M+H)⁺: calculado 511,31396, encontrado 511,31140.

Métodos y materiales biológicos

Cultivo celular general

30 Se cultivaron células en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) o medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, por sus siglas en inglés) suplementado con suero (suero bovino fetal al 10 %) y L-glutamina (2 mM) y se incubaron en una incubadora de cultivo tisular Heracell 240i a 37 °C C y CO₂ al 5 %.

Ensayo de viabilidad celular

Se sembraron células en placas de 96 pocillos a 2000 células/pocillo en 100 µl de medio DMEM o RPMI que contenía FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM y se incubaron durante 48 h en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de 48 horas, se aspiró el medio de cada pocillo y se reemplazó con 95 µl de medio nuevo. Los compuestos, incluido DMSO, se prepararon a 20X en medio DMEM en una placa intermedia separada de 96 pocillos. Después se añadieron 5 µl de la placa intermedia a cada pocillo que contenía células. Las células no tratadas se incubaron con DMSO (0,1 % v/v). Después de 5 días, se añadió reactivo de viabilidad celular PrestoBlue™ (10 µl) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 60 - 90 min. La emisión de fluorescencia se detectó utilizando un lector de placa de fluorescencia (excitación 540 nm, emisión 590 nm). Todas las condiciones se normalizaron con respecto a las células no tratadas (100 %) y las curvas dosis-respuesta se ajustaron usando el software GraphPad Prism.

Ensayo de apoptosis - Uso del sistema IncuCyte-ZOOM® de Essen BioScience

Se sembraron células en placas de fondo óptico negras Nunc™ de 96 pocillos (Thermo Scientific) a 3000 células/pocillo en 100 µl de medio DMEM o RPMI que contenía FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM y se incubaron durante 48 h en una incubadora a 37°C. °C y CO₂ al 5 %. El medio se reemplazó con 95 µl de medio nuevo que contenía NucView™ 488 a una concentración de 1 µM y se añadieron fármacos o DMSO a lo largo de un gradiente de concentración, como se describe en el ensayo de viabilidad celular, y las placas se colocaron en el IncuCyte para la incubación. El crecimiento celular y la apoptosis se monitorizaron durante 5 días usando microscopía de campo claro y canales de fluorescencia verde (excitación 460 nm, emisión 524 nm). El software IncuCyte realizó la confluencia celular (campo claro) y el recuento apoptótico (verde).

Ensayo de ciclo celular

Se sembraron células a 5000 células/pocillo en 100 µl de medio DMEM o RPMI que contenía FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM en placas de fondo óptico negras Nunc™ de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 48 horas, el medio se retiró por aspiración y se reemplazó con 95 µl de medio nuevo. Los compuestos, incluido DMSO, se prepararon a 20X en medio DMEM o RPMI en una placa separada y después se añadieron 5 µl a cada pocillo que contenía células. Las células no tratadas se incubaron con DMSO (0,1 % v/v). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y después se añadieron 100 µl de PFA al 8 % en PBS a cada pocillo y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. El medio/PFA se retiró y los pocillos se lavaron con 100 µl de PBS (x3). Se añadieron a cada pocillo 100 µl de tampón de bloqueo (PBS que contenía BSA al 1,1 % y Triton X100 al 0,2 %) y se dejó durante 30 minutos. Se añadieron 30 µl de una disolución de anticuerpo primario que contenía anticuerpo monoclonal de ratón mixto anti-Ciclina B1 (1:300) y anticuerpo policlonal de conejo anti-pHH3 (1:800) a cada pocillo y las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después se eliminó la disolución y los pocillos se lavaron con 100 µl de tampón de bloqueo (x3). Se añadieron 100 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 30 µl de una disolución de anticuerpo secundario que contenía 4 µg/ml de DAPI, el anticuerpo antiratón de asno AlexaFluor® 488 (1:500) y el anticuerpo anti-conejo de cabra AlexaFluor® 594 (1:500) a cada pocillo y se dejaron incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se retiró la disolución y las placas se lavaron con 100 µl de PBS (x3) y se almacenaron en 100 µl de PBS en la oscuridad hasta tomar imágenes. Las imágenes se adquirieron usando el microscopio de fluorescencia scan^R de Olympus o el sistema ImageXpress de Molecular Devices y se analizaron usando el software scan^R o ImageXpress. Las células se clasificaron según su estado del ciclo celular por el contenido de ADN y la intensidad.

Protocolo de transferencia Western

Se colocaron en placas células a 1x10⁶ células/pocillo en 2 ml de medio DMEM o RPMI que contenía FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM en placas de 6 pocillos y se incuban a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 24 horas, los medios se aspiraron y se reemplazaron con 2 ml de medio DMEM que contenía FBS al 0,1 % y L-glutamina 2 mM y las células se incubaron durante 24 horas más. Después se añadieron 2 µl de compuestos disueltos en DMSO a la concentración apropiada a cada pocillo y las placas se incubaron durante 30 minutos. Después se añadieron 222 µl de FBS a cada pocillo (dando una concentración final del 10 %) y las células se incubaron durante una hora. Los lisados celulares se prepararon después usando 100 µl de tampón de lisado MD Anderson por pocillo. La concentración de proteína celular total en cada lisado se determinó usando el Reactivo de proteína avanzado rojo Precision núm. 2 del citoesqueleto. Se hirieron 25 µl de tampón de carga de muestra de SDS-PAGE, 10 µl de DDT 1 M, lisado y agua hasta 100 µl para proporcionar disoluciones de 2-3 mg/ml a 100 °C durante 3 minutos. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en geles prefabricados BioRad al 4-15 % durante 60 minutos a 140 V y se transfirieron a membranas de PVDF durante 150 minutos a 210 mA. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente usando el tampón de bloqueo de Roche y después se añadieron anticuerpos primarios en tampón de bloqueo al 0,5 % a 4 °C durante la noche. Las membranas se lavaron con TBS/T (x3, 5 minutos) y después se añadió anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) durante una hora a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional con TBS/T (x3, 5 minutos) y TBS (x2, 5 minutos), se detectó HRP mediante quimioluminiscencia mejorada con peroxidasa (POD ECL de Roche) y se visualizaron bandas usando película de rayos X o el sistema de imágenes ChemiDoc™ MP de BioRad.

Ensayo de migración celular

Se colocaron en placas células a 50000 células/pocillo en 100 μ l de medio DMEM o RPMI que contenía FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM en una placa ImageLock de 96 pocillos de Essen BioScience y se dejaron durante la noche para que se adhiriera en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se crearon heridas por rasguños en cada pocillo usando el WoundMaker™ suministrado por Essen BioScience y cada pocillo se lavó con medios (100 μ l, x2) para retirar las células flotantes. Se añadieron 95 μ l de medio nuevo en cada pocillo. Los compuestos, incluido DMSO, se prepararon a 20X en medio DMEM en una placa separada y después se añadieron 5 μ l a cada pocillo que contenía células. Las células no tratadas se incubaron con DMSO (0,1 % v/v). Las imágenes se registraron cada 30 minutos usando el IncuCyte-ZOOM™ durante 24 horas. El análisis del ancho de la herida para controlar la migración celular se realizó utilizando el software IncuCyte.

Ensayo de pez cebra

Se recogieron embriones de pez cebra naturales de parejas reproductoras AB-TPL y se criaron a 28 °C en medio de embrión E3. Los embriones, 2 días después de la fertilización (dpf), se trataron con compuesto 506 o Dasatinib a 100 μ M y DMSO (0,1 % v/v) como control negativo, durante 2 horas antes de la amputación de la cola. Después se recortaron las colas de los embriones. Los embriones se incubaron con fármaco durante 2 horas más antes de lavarlos y reemplazarlos con medios E3 nuevos. Los embriones se dejaron desarrollar en medios E3 a 28 °C durante 2 días, después de lo cual, se tomaron imágenes por microscopía de contraste de fase.

Ensayo de detección de cinasa

Se determinaron los valores de CI₅₀ del compuesto a partir de curvas de dilución 1:3 de 10 puntos comenzando a 100 μ M o 10 μ M con ATP 10 μ M, mediante Reaction Biology Corp. Para la detección completa del cinoma, los compuestos se sometieron a detección con respecto a 340 cinasas naturales con una dosis única de 1 μ M, por duplicado, con 10 μ M de ATP por Reaction Biology Corp. Los datos se promediaron y se representaron como porcentaje de actividad enzimática en relación con DMSO, como control negativo, usando el software DiscoverRX TREEspot™.

PD de pez cebra/ensayo de toxicología

Se recogieron embriones de pez zebra cldnb:EGFP transgénicos de parejas reproductoras y se criaron a 28 °C en medio de embrión E3. Se trataron los embriones 1 dpf con 506 o dasatinib a diferentes dosis (10-750 μ M) a 20 hpf, 36 hpf y 48 hpf, o DMSO (0,1 % v/v). Se tomaron imágenes de los embriones de pez cebra por microscopía fluorescente a 72 hpf. Ensayos de seguridad. Se recogieron embriones de pez cebra naturales de parejas reproductoras AB-TPL y se criaron a 28 °C en medio de embrión E3. Se trataron embriones 1 dpf con 506 o dasatinib a 100 μ M y DMSO (0,1 % v/v) como control negativo, durante 4 h antes de lavarlos y reemplazarlos con medios E3 nuevos. Para el tratamiento con PP20, los peces se incubaron durante 2 h después de la amputación y después se reemplazaron con medios E3 nuevos. Los embriones se dejaron desarrollar en medios E3 a 28 °C durante 2 días, después de lo cual, se tomaron imágenes por microscopía óptica. La cría de pez cebra se realizó bajo la Licencia de Ministerio del Interior de conformidad con la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) de 1986 y aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Edimburgo.

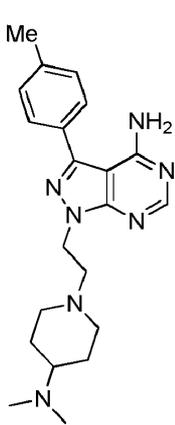
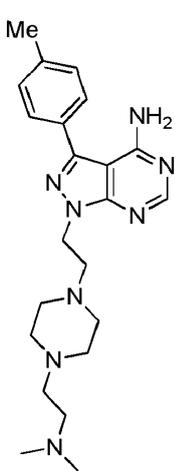
Estudio de PD in vivo

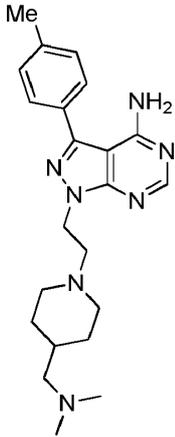
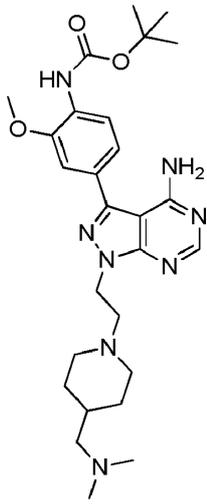
Se generaron xenoinjertos tumorales en ratones mediante inyección de 2 millones de células HCT116 por vía subcutánea. Se permitió que los tumores crecieran hasta 3-4 mm de diámetro. Se administró una dosis diaria de 50 mg/kg de 506 en agua pura por sonda oral. Los ratones se sacrificaron 3 h después de la última dosis y los tumores se extirparon, se fijaron en formaldehído al 4 % en tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,2) y se embebieron en parafina. Las secciones se cortaron usando un microtomo Reichert-Jung 1150/Autocut para realizar la inmunquímica de fosfo-SRC. La recuperación de antígeno se realizó usando tratamiento térmico a presión en un horno de microondas durante 10 minutos en tampón de citrato 10 mM pH = 6. Las secciones se bloquearon para la peroxidasa endógena con posterior incubación con anticuerpo anti-fosfo-SRC (Cell Signaling Technology) (dilución 1:200) a 4 °C durante la noche. La tinción se desarrolló usando EnVision (Dako) y diaminobencideno (Dako) antes los portaobjetos se contratiñeron en hematoxilina, se deshidrataron y se montaron en DPX. Las imágenes se dividieron en un escáner de diapositivas digital NanoZoomer, Hammamatsu. La tinción fue puntuada por un solo observador experimentado, con enmascaramiento del tratamiento, usando un método ponderado de histopuntuación.

Tabla 1: Actividades de Dasatinib e inhibidores con alta selectividad para SRC con respecto a ABL

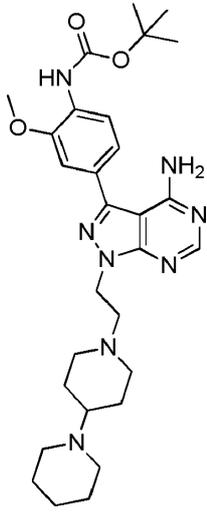
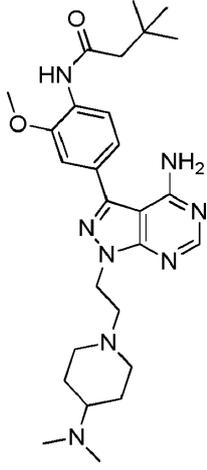
CE₅₀ = ->10 μM > +>1 μM > ++>0,1 μM > +++

CI₅₀ = ->1,0 μM > +>100 nM > ++>10 nM > +++

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE ₅₀)	Inhibición del objetivo (CI ₅₀)
109		MCF7: -	ABL: -
		MDA-MB-231: ND	BRK/PTK6: ND
		SYF (-/- Src): ND	KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: -
			FGR: +
			FRK/PTK5: +
			FYN: +
			HCK: -
			LCK: +
			LYN: +
	SRC: +		
	YES: ++		
	CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} = 50		
105		MCF7: -	ABL: -
		MDA-MB-231: ND	BRK/PTK6: ND
		SYF (-/- Src): ND	KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: -
			FGR: +
			FRK/PTK5: -
			FYN: +
			HCK: -
			LCK: -
			LYN: +
	SRC: +		
	YES: +		
	CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} = 25		

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición del objetivo (CI50)
112			ABL: -
			BRK/PTK6: ND
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: -
		MCF7: -	FGR: +
		MDA-MB-231: ND	FRK/PTK5: -
		SYF (-/- Src): ND	FYN: +
			HCK: -
			LCK: -
			LYN: -
	SRC: +		
	YES: +		
	$CI_{50}^{ABL} / CI_{50}^{SRC} = 25$		
503			ABL: +
			BRK/PTK6: ++
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
		MCF7: ++	RET: -
		MDA-MB-231: ++	
		SYF (-/- Src): -	BLK: +++
		NCI-H358: ++	FGR: +++
		PC3: ND	FRK/PTK5: +++
		HT1080: ND	FYN: +++
		MEF: +	HCK: +++
		BT549: ND	LCK: +++
	LYN: +++		
	SRC: +++		
	YES: +++		
	$CI_{50}^{ABL} / CI_{50}^{SRC} >350$		

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición del objetivo (CI50)
506		MCF7: +++	ABL: +
		MDA-MB-231: +++	BRK/PTK6: ++
		SYF (-/- Src): -	KIT: -
		NCI-H358: +++	mTOR: -
		PC3: +	PDGFRa: -
		HT1080: -	RET: -
		MEF: -	BLK: +++
		BT549: -	FGR: +++
			FRK/PTK5: +++
			FYN: +++
			HCK: +++
			LCK: +++
			LYN: +++
			SRC: +++
	YES: +++		
	CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} >950		
518		MCF7: +++	ABL: +
		MDA-MB-231: +++	BRK/PTK6: ++
		SYF (-/- Src): -	KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: +++
			FGR: +++
			FRK/PTK5: +++
			FYN: +++
			HCK: +++
			LCK: +++
			LYN: +++
			SRC: +++
	YES: +++		
	CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} >800		

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición del objetivo (CI50)
519			ABL: +
			BRK/PTK6: ++
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: +++
		MCF7: ++	FGR: +++
		MDA-MB-231: +++	FRK/PTK5: +++
		SYF (-/- Src): +	FYN: +++
			HCK: +++
			LCK: +++
			LYN: +++
	SRC: +++		
	YES: +++		
	CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} >1340		
526			ABL: -
			BRK/PTK6: +
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: +
		MCF7: -	FGR: ++
		MDA-MB-231: - SYF	FRK/PTK5: -
		(-/- Src): -	FYN: +
			HCK: +
			LCK: ++
			LYN: +
	SRC: +		
	YES: ++		
	CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} > 85		

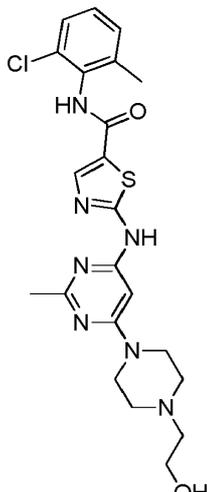
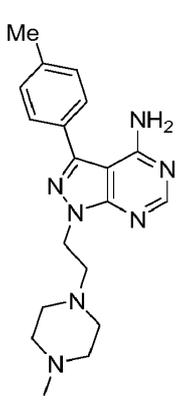
Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición del objetivo (CI50)
533		MCF7: ++ MDA-MB-231: ++ SYF (-/- Src): +	ABL: -
			BRK/PTK6: ++
			KIT: +
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: +++
			FGR: +++
			FRK/PTK5: +
			FYN: +++
			HCK: +++
			LCK: +++
			LYN: +++
SRC: +++			
YES: +++			
			CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} = 340
540		MCF7: - MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): -	ABL: -
			BRK/PTK6: +
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: +
			FGR: ++
			FRK/PTK5: -
			FYN: +
			HCK: +
			LCK: ++
			LYN: +
SRC: +			
YES: ++			
			CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} = 49

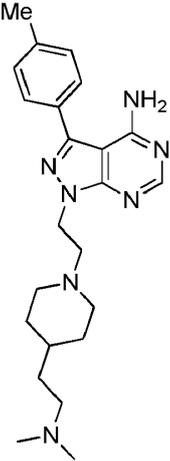
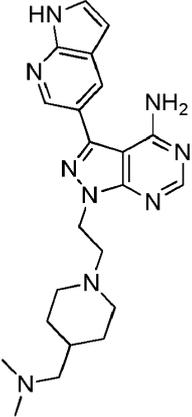
Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición del objetivo (CI50)	
543		SYF (-/- Src): ND	ABL: -	
			BRK/PTK6: +	
			KIT: -	
			mTOR: -	
			PDGFRa: -	
			RET: -	
			BLK: +	
			MCF7: +	FGR: +++
			MDA-MB-231: +	FRK/PTK5: +
			FYN: +	
			HCK: +	
			LCK: ++	
LYN: +				
SRC: ++				
YES: +++				
			$CI_{50}^{ABL} / CI_{50}^{SRC} >50$	
553		SYF (-/- Src): -	ABL: -	
			BRK/PTK6: ++	
			KIT: -	
			mTOR: -	
			PDGFRa: -	
			RET: -	
			BLK: ++	
			MCF7: +	FGR: +++
			MDA-MB-231: ++	FRK/PTK5: ++
			FYN: +++	
			HCK: ++	
			LCK: +++	
LYN: +++				
SRC: +++				
YES: +++				
			$CI_{50}^{ABL} / CI_{50}^{SRC} >2850$	

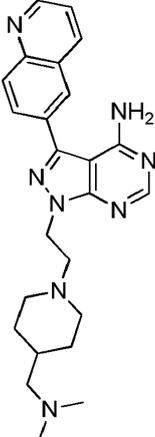
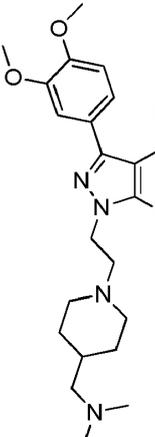
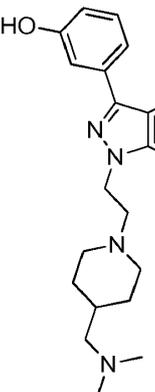
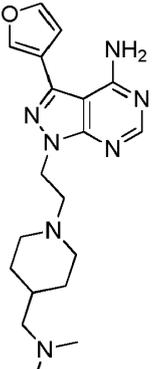
Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición del objetivo (CI50)
565			ABL: +
			BRK/PTK6: ++
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: +++
		MCF7: ++	FGR: +++
		MDA-MB-231: +++	FRK/PTK5: +++
		SYF (-/- Src): -	FYN: +++
			HCK: +++
			LCK: +++
	LYN: +++		
	SRC: +++		
	YES: +++		
	$CI_{50}^{ABL} / CI_{50}^{SRC} > 350$		
584			ABL: -
			BRK/PTK6: ++
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: ++
		MCF7: ND	FGR: +++
		MDA-MB-231: ++	FRK/PTK5: +
		SYF (-/- Src): ND	FYN: +
			HCK: +
			LCK: +++
	LYN: ++		
	SRC: ++		
	YES: +++		
	$CI_{50}^{ABL} / CI_{50}^{SRC} = 75$		

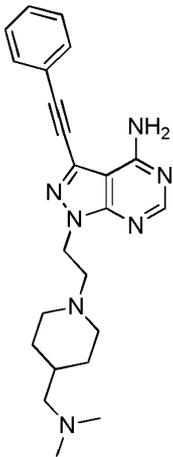
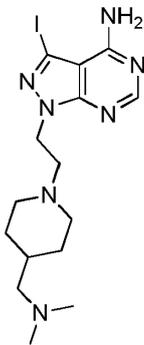
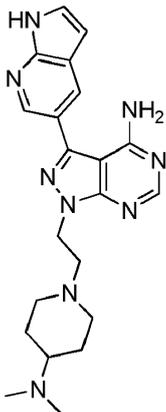
Tabla 2: Actividades de Dasatinib y estructuras relacionadas con los nuevos inhibidores pero que exhiben bajas propiedades antiproliferativas o baja selectividad para SRC con respecto a ABL

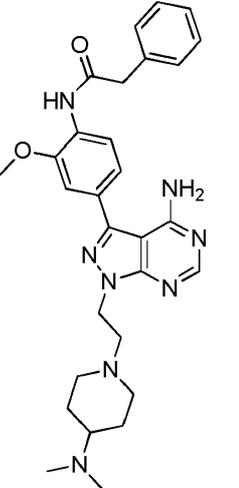
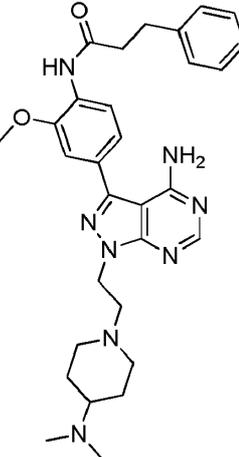
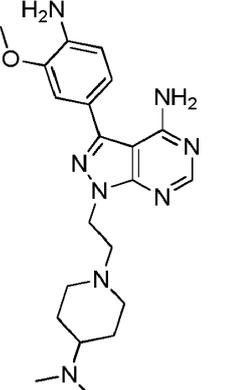
CE ₅₀ = ->10 μM > + >1 μM > ++ >0,1 μM > +++
Cl ₅₀ = ->1,0 μM > + >100 nM > ++ >10 nM > +++

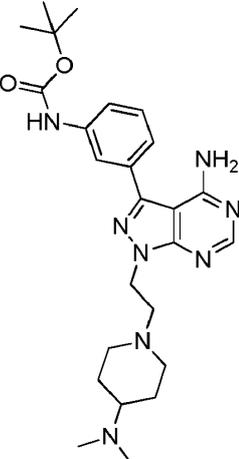
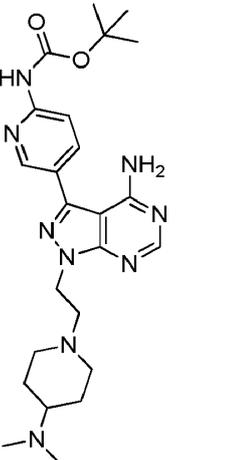
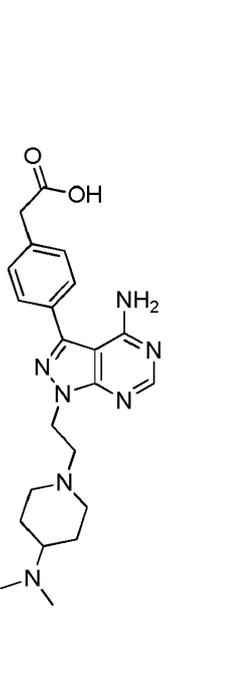
Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE ₅₀)	Inhibición objetivo (Cl ₅₀)
Dasatinib (inhibidor estándar de oro Abl/Src) CONTROL POSITIVO			ABL: +++
			BRK/PTK6: ++
			KIT: ++
			mTOR: -
			PDGFRa: +++
		MCF7: +++	RET: +
		MDA-MB-231: +++	
		SYF (-/- Src): +	BLK: +++
		NCI-H358: +	FGR: +++
		PC3: +	FRK/PTK5: +++
		HT1080: -	FYN: +++
		MEF: +	HCK: +++
		BT549: -	LCK: +++
			LYN: +++
			SRC: +++
			YES: +++
			Cl ₅₀ ^{ABL} / Cl ₅₀ ^{SRC} <1
103			ABL: -
			BRK/PTK6: ND
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: -
			BLK: -
		MCF7: -	FGR: +
		MDA-MB-231: ND	FRK/PTK5: -
		SYF (-/- Src): ND	FYN: -
			HCK: -
			LCK: -
			LYN: -
			SRC: +
			YES: +
			Cl ₅₀ ^{ABL} / Cl ₅₀ ^{SRC} = 10

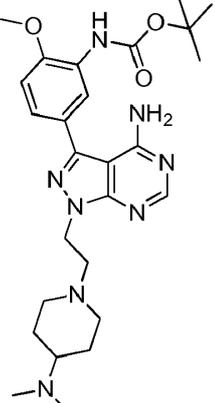
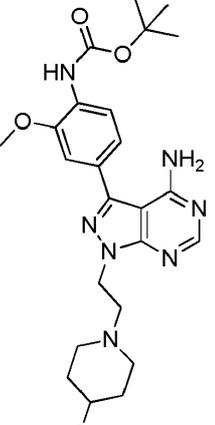
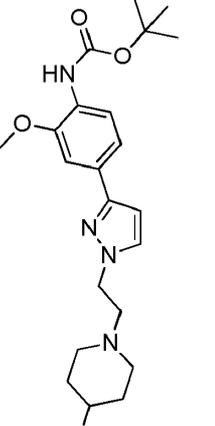
Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE ₅₀)	Inhibición objetivo (CI ₅₀)
113			ABL: -
		BRK/PTK6: ND	
		KIT: -	
		mTOR: -	
		PDGFRa: -	
		RET: -	
		BLK: -	
		MCF7: -	FGR: +
		MDA-MB-231: ND	FRK/PTK5: -
		SYF (-/- Src): ND	FYN: -
			HCK: -
		LCK: -	
LYN: -			
SRC: -			
YES: +			
CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} = 7			
221			ABL: +
		BRK/PTK6: ND	
		KIT: -	
		mTOR: -	
		PDGFRa: -	
		RET: +	
		BLK: +	
		MCF7: +	FGR: ++
		MDA-MB-231: +	FRK/PTK5: +
		SYF (-/- Src): ND	FYN: ++
			HCK: +
		LCK: +	
LYN: ++			
SRC: ++			
YES: ++			
CI ₅₀ ^{ABL} / CI ₅₀ ^{SRC} = 4			

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición objetivo (CI50)
223		MCF7: - MDA-MB-231: ND SYF (-/- Src): ND	N/D
224		MCF7: - MDA-MB-231: ND SYF (-/- Src): ND	N/D
225		MCF7: - MDA-MB-231: ND SYF (-/- Src): ND	N/D
226		MCF7: - MDA-MB-231: ND SYF (-/- Src): ND	N/D

230		MCF7: -	N/D
		MDA-MB-231: -	
		SYF (-/- Src): ND	
232		MCF7: -	N/D
		MDA-MB-231: ND	
		SYF (-/- Src): ND	
402			ABL: +
			BRK/PTK6: ND
			KIT: -
			mTOR: -
			PDGFRa: -
			RET: +
			BLK: +
		MCF7: +	FGR: ++
		MDA-MB-231: ND	FRK/PTK5: +
		SYF (-/- Src): ND	FYN: ++
	HCK: -		
	LCK: +		
	LYN: ++		
	SRC: ++		
	YES: ++		
	Cl ₅₀ ^{ABL} / Cl ₅₀ ^{SRC} = 4		

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición objetivo (CI50)
530		MCF7: - MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): -	N/D
531		MCF7: + MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): -	N/D
532		MCF7: + MDA-MB-231: + SYF (-/- Src): -	N/D

Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición objetivo (CI50)
542		MCF7: - MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): ND	N/D
549		MCF7: - MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): ND	N/D
556		MCF7: - MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): -	ABL: - BRK/PTK6: - KIT: - mTOR: - PDGFRa: - RET: - BLK: - FGR: - FRK/PTK5: - FYN: - HCK: - LCK: - LYN: - SRC: - YES: - No se encontró inhibición

<p>559</p>		<p>MCF7: - MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): ND</p>	<p>N/D</p>
<p>593</p>		<p>MCF7: ND MDA-MB-231: + SYF (-/- Src): ND</p>	<p>N/D</p>
<p>597</p>		<p>MCF7: ND MDA-MB-231: - SYF (-/- Src): ND</p>	<p>N/D</p>

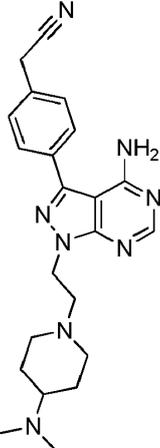
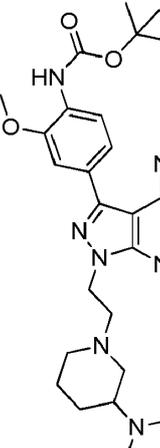
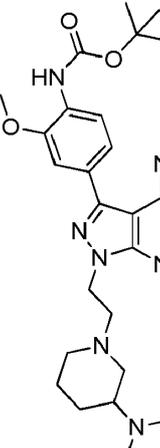
Código	Estructura	Actividad antiproliferativa (CE50)	Inhibición objetivo (CI50)
5-100		MCF7: ND	N/D
		MDA-MB-231: -	
5-103		MCF7: ND	N/D
		MDA-MB-231: +	
5-103		SYF (-/- Src): ND	N/D
		SYF (-/- Src): ND	

Tabla 3: Valores de CI_{50} (nM) calculados para Dasatinib, compuesto 506 y compuesto 503 con una selección de cinasas recombinantes.

Cinasa\Resultado positivo	Dasatinib	506	503
Abl	<0,5	479	189
Fyn ¹	<0,5	4,1	4,6
Kit	39	5130	7130
mTOR	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
PDGFR α	9,9	>10 ⁴	>10 ⁴
Src ¹	<0,5	<0,5	<0,5
Ret	433	>10 ⁴	>10 ⁴
Yes ¹	<0,5	<0,5	<0,5

¹Miembro de SFK.

Tabla 4: Detección de células (CE₅₀*)

Línea celular	DASATINIB	506	518	519	533	553	565
MDA-MB-231	13 nM	11 nM	39 nM	85 nM	167 nM	73 nM	31 nM
Células SYF (falta de Src)	1540 nM	21.400 nM	15.100 nM	8500 nM	7040 nM	15.400 nM	15.600 nM

* CE₅₀: Perfil de respuesta de dosis semilogarítmica de 8 puntos con respecto al criterio de valoración de viabilidad celular

5 **Tabla 5: Detección de cinasa (CI₅₀) (*) Familia Src**

Cinasa	DASATINIB	506	518	519	533	553	565
ABL1	+++	+	+	+	-	-	+
BRK	++	++	++	++	++	++	++
c-KIT	++	-	-	-	+	-	-
mTOR	-	-	-	-	-	-	-
PDGFRa	+++	-	-	-	-	-	-
RET	+	-	-	-	-	-	-
(*) BLK	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
(*) SRC	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(*) FGR	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(*) FRK	+++	+++	+++	+++	+	++	+++
(*) FYN	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(*) HCK	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
(*) LCK	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(*) LYN	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
(*) YES	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CI ₅₀ ABL/CI ₅₀ SRC	1	958	814	1616	340	2868	370

CI₅₀ = ->1,0 µM > + >100 nM > ++ >10 nM > +++

Tabla 6: Propiedades fisicoquímicas y ADME

Propiedades	DASATINIB	506	518	519	533	553	565
MW	488,0	510,6	536,7	550,7	500,6	479,6	509,6
cLogP ^{OSIRIS}	3,63	2,22	3,01	3,35	2,23	2,29	2,22
Solubilidad en PBS	<0,1 mg/mL	>100 mg/ml	N/D	N/D	N/D	N/D	>100 mg/ml
% libre en suero de rata	3 %	19,1 %	13,4 %	10,6 %	10,6 %	N/D	13,9 %
% libre en suero humano	6 %	9,4 %	17,2 %	14,3 %	11,8 %	N/D	17,7 %
³⁰ mm Estabilidad en microsoma hepático*	N/D	93,6 %	87,0 %	N/D	98,8 %	N/D	78,7 %

*% de fármaco no modificado después de 30 minutos de incubación con microsomas hepáticos. Controles: lidocaína 92,0 %; Propanolol 68,1 %; Verapamilo 8,1 %.

Tabla 7: inhibición del canal de hERG, estabilidad en plasma y biodisponibilidad oral

Propiedades	506	518	519	533	553	565
inhibición de hERG (CI50, μM)	18,2	20,1	12,6	2,55	12,6	>25
Estabilidad en plasma humano*	100 %	N/D	N/D	N/D	98,3 %	94 %
Estabilidad en plasma de ratón*	100 %	N/D	N/D	N/D	70,4 %	100 %
Estabilidad en plasma de rata*	100 %	N/D	N/D	N/D	68,2 %	93,3 %
Biodisponibilidad oral	25 %	N/D	N/D	N/D	N/D	52 %
Semivida en plasma	2,9 h	N/D	N/D	N/D	N/D	2 h

*% de fármaco no modificado después de 120 min en plasma. Controles: Eucatropina 10,5 % (humano) y 20,3 (ratón); Diltiazem 21,5 % (rata).

5 **Tabla 8: valores de inhibición de CYP P450 a 10 μM . Todos los compuestos condujeron a menos del 50 % de inhibición de la actividad metabólica a la concentración evaluada.**

Propiedades	506	518	519	533	553	565
CYP450 1A2 (% de inhibición)	24,6 %	6,9 %	-1,6 %	8,3 %	N/D	4,3 %
CYP450 3A4 (% de inhibición)	-74,6 %	-29,8 %	-12,1 %	3,1 %	N/D	5,7 %
CYP450 2C9 (% de inhibición)	-23,1 %	-92,3 %	-70,3 %	-35,4 %	N/D	-35,8 %
CYP450 2D6 (% de inhibición)	31,8 %	6,7 %	3,0 %	7,4 %	N/D	9,4 %
CYP450 2C19 (% de inhibición)	-5,4 %	-6,5 %	-3,1 %	26,8 %	N/D	-0,4 %

Referencias

- 10 Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B. y Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239-1249 (2011).
2. Smith, A. Screening of drug discovery. *Nature* 418, 451-463 (2002).
3. Holdgate, G. *et al.* Biophysical Methods in Drug Discovery from Small Molecule to Pharmaceutical. *Methods Mol. Biol.* 1008, 327-355 (2013).
4. McInnes, C. Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr. Opin. Chem Biol.* 11, 494-502 (2007).
- 15 5. Vistoli, G., Pedretti, A. y Testa, B. Assessing drug-likeness—what are we missing? *Drug Discov. Today* 13, 285-294 (2008).
6. Kamb, A., Wee, S. y Lengauer, C. Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 115-20 (2007).
7. Chin, L. y Gray, J. W. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 452, 553-563 (2008).
- 20 8. Stommel, J. M. *et al.*, Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 318, 287-290 (2007).
9. Carragher, N., Unciti-Broceta, A. y Cameron, D. Advancing cancer drug discovery towards more agile development of targeted combination therapies. *Fut. Med. Chem.* 4, 87-105 (2012).
- 25 10. Knight, Z. A. Lin, H. y Shokat, K. M. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 130-137 (2010).
11. Kola, I. y Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711-716

- (2004).
12. Sassoon, I. y Blanc, V. Tubercia Antibody-drug conjugate (ADC) clinical pipeline: a review. *Methods Mol. Biol.* 1045, 1-27 (2013).
- 5 13. Velema, W. A., Szymanski, W. y Feringa, B. L. Photopharmacology: beyond proof of principle. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 2178-2191 (2014).
14. Versteegen, R. M., Rossin, R., ten Hoeve, W., Janssen H. M. y Robillard, M. S. Click to Release: instantaneous Doxorubicin Elimination upon Tetrazine Ligation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 14112-14116 (2013).
15. Clavel, C. M. *et al.* Thermo-responsive Chlorambucil Derivatives for Tumour Targeting. *Angew. Chem., Int. Ed.* 50, 7124-7127 (2011).
- 10 16. Weiss, J. T. *et al.* Extracellular palladium-catalyzed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally-activated prodrug approach. *Nat. Commun.* 5, 3277 (2014).
17. Weiss, J. T. *et al.* Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. *J. Med. Chem.* 57, 5395-5404 (2014).
- 15 18. Lee, J. A.; Uhlík, M. T.; Moxham, C. M.; Tomandl, D. y Sail, D. J. El Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy. *J. Med. Chem.* 55, 4527-4538 (2012).
19. Eder, J., Sedrani, R. y Wiesmann, C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 577-587 (2014).
20. Carragher, N.O., Brunton, V. G. y Frame, M. C. Combining imaging and pathway profiling: an alternative approach to cancer drug discovery. *Drug Discov. Today* 17, 203-214 (2012).
- 20 21. Cohen, P. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, 309-315 (2002).
22. Zhang, J.; Yang, P. L. y Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 9, 28-39 (2009).
- 25 23. Lu, L. *et al.* Hippo signaling is a potent *in vivo* growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1437-1442 (2010).
24. Zhou, B.-B. S. y Bartek, J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat. Rev. Cancer* 4, 216-225 (2004).
25. Fujimoto, H. *et al.* Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death Differ.* 13, 1170-1180 (2006).
- 30 26. Wilhelm, S. *et al.* Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 835-844 (2006).
27. Greuber, E. K.; Smith-Pearson, P.; Wang, J. y Pendergast, A. M. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 13, 559-571 (2013).
- 35 28. Noren, N. K.; Foos, G.; Hauser, C. A. y Pasquale, E. B. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nat. Cell Biol.* 8, 815-825 (2006).
29. Allington, T. M.; Galliher-Beckley, A. J. y Schiemann, W. P. La Activated Abl kinase inhibits oncogenic transforming growth factor-beta signaling and tumorigenesis in mammary tumors. *FASEB J.* 23, 4231-4243 (2009).
30. Gil-Henn, H. *et al.* Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer *in vivo*. *Oncogene* 32, 2622-2630 (2013).
- 40 31. Hanke, J. H. *et al.* Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271, 695-701 (1996).
32. Tatton, L., Morley, G. M., Chopra, R. y Khwaja, A. The Src-selective kinase inhibitor PP1 also Inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 4847-4853 (2003).
- 45 33. Jester, B. W., Gaj, A., Shomin, C. D., Cox, K. J. y Ghosh, I. Testing the promiscuity of commercial kinase inhibitors against the AGC kinase group using a split-luciferase screen. *J. Med. Chem.* 55, 1526-1537 (2012).
34. Diner, P., Alao, JP, Söderlund, J., Sunnerhagen, P. y Grøtli, M. Preparation of 3-substituted-1-isopropyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amines as RET kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 55, 4872-4876 (2012).

35. Apsel, B. et al. Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nat. Chem. Biol.* 4, 691-699 (2008).
36. Antonelli, A., et al. CLM29, a multi-target pyrazolopyrimidine derivative, has antineoplastic activity in medullary thyroid cancer *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell Endocrinol.* 393, 56-64 (2014).
- 5 37. Schindler, T. et al. Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol. Cell.* 3, 639-648 (1999).
38. Knowles, P. P. et al. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* 281, 33577-87 (2006).
- 10 39. Liu, Y. y Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* 2, 358-364 (2006).
40. Liu, Y. et al. Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol.* 6, 671-678 (1999).
41. Dar, A. C., Lopez, M. S. y Shokat, K. M. Small molecule recognition of c-Src via the Imatinib-binding conformation. *Chem. Biol.* 15, 1015-1022 (2008).
- 15 42. Hann, M. M. y Keserü, G. M. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 355-365 (2012).
43. Hsieh, A. C. et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 485, 55-61 (2012).
- 20 44. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. (2006). Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature Med* Aug;12(8):908-16.
45. Allington, T. M.; Galliher-Beckley, A. J.; Schiemann, W. P. Activated Abi kinase inhibits oncogenic transforming growth factor-beta signaling and tumorigenesis in mammary tumors. *FASEB J.* 2009, 23, 4231-4243.
- 25 46. Boyce, B.F., Xing, L., Yao, Z., Yamashita, T., Shakespeare, W.C., Wang, Y., Metcalf, C.A., 3rd, Sundaramoorthi, R., Dalgarno, D.C., Iulucci, J.D., and Sawyer, T.K. (2006). SRC inhibitors in metastatic bone disease. *Clin Cancer Res* 12, 6291s-6295s.
47. Brunton, V.G., y Frame, M.C. (2008). Src and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 8, 427-432.
- 30 48. Chaturvedi, D., Gao, X., Cohen, M.S., Taunton, J., y Patel, T.B. (2009). Rapamycin induces transactivation of the EGFR and increases cell survival. *Oncogene* 28, 1187-1196.
49. Creedon, H., y Brunton, V.G. (2012). Src kinase inhibitors: promising cancer therapeutics? *Crit Rev Oncog* 17, 145-159.
50. Girotti R et al. (2015). Paradox-Breaking RAF Inhibitors that Also Target SRC Are Effective in Drug-Resistant BRAF Mutant Melanoma. *Cancer Cell* 27(1): 85-96.
- 35 51. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. (2006). Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nature Med* 12(8):908-16.
52. Qiu Z, Cang Y, Goff SP. (2010). Abl family tyrosine kinases are essential for basement membrane integrity and cortical lamination in the cerebellum. *J Neurosci.* 2010 Oct 27;30(43):14430-9.
- 40 53. De Wispelaere, M., Lacroix, A.J., y Yang, P.L. (2013). The small molecules AZD0530 and dasatinib inhibit dengue virus RNA replication via Fyn kinase. *J Virol* 87, 7367-7381.
54. Duxbury, M.S., Ro, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W., y Whang, E.E. (2004). Inhibition of SRC tyrosine kinase impairs inherent and acquired gemcitabine resistance in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10, 2307-2318.
- 45 55. Gil-Henn, H.; Patsialou, A.; Wang, Y.; Warren, M. S.; Condeelis, J. S.; Koleske, A. J. Arg/Ab12 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer *in vivo*. *Oncogene*, 2013, 32, 2622-2630.
56. Hawthorne, V.S., Huang, W.C., Neal, C.L., Tseng, L.M., Hung, M.C., y Yu, D. (2009). ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7, 592-600.

57. Kopetz, S., Lesslie, D.P., Dallas, N.A., Park, S.I., Johnson, M., Parikh, N.U., Kim, M.P., Abbruzzese, J.L., Ellis, L.M., Chandra, J., y Gallick, G.E. (2009). Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res* 69, 3842-3849.
- 5 58. Mayer, E.L., y Krop, I.E. (2010). Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* 16, 3526-3532.
59. Mccarthy, S.D., Jung, D., Sakac, D., y Branch, D.R. (2014). c-Src and Pyk2 protein tyrosine kinases play protective roles in early HIV-1 infection of CD4+ T-cell lines. *J Acquir Immune Defic Syndr* 66, 118-126.
- 10 60. Murrills, R.J., Fukayama, S., Boschelli, F., Matteo, J.J., Owens, J., Golas, J.M., Patel, D., Lane, G., Liu, Y.B., Carter, L., Jussif, J., Spaulding, V., Wang, Y.D., Boschelli D.H., Mckew, J.C., Li, X.J., Lockhead, S., Milligan, C., Kharode, Y.P., Diesl, V., Bai, Y., Follettie, M., Bex, F.J., Komm, B., y Bodine, P.V. (2012). Osteogenic effects of a potent Src-over-Abl-selective kinase inhibitor in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 340, 676-687.
- 15 61. Myoui, A., Nishimura, R., Williams, P.J., Hiraga, T., Tamura, D., Michigami, T., Mundy, G.R., y Yoneda, T. (2003). C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis. *Cancer Res* 63, 5028-5033.
62. Noren, N. K.; Foos, G.; Hauser, C. A.; Pasquale, E. B (2006). The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nat. Cell Biol.* 8, 815-825.
- 20 63. Park, G.B., Kim, D., Kim, Y.S., Kim, S., Lee, H.K., Yang, J.W., y Hur, D.Y. (2014; The Epstein-Barr virus causes epithelial-mesenchymal transition in human cornea) epithelial cells via Syk/src and Akt/Erk signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, 1770-1779.
64. Sawyers, C.L., Mclaughlin, J., Goga, A., Havlik, M., y Witte, O. (1994). The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77, 121-131.
- 25 65. Wheeler, D.L., Iida, M., Kruser, T.J., Nechrebecki, M.M., Dunn, E.F., Armstrong, E.A., Huang, S., y Harari, P.M. (2009). Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther* 8, 696-703.
66. Zhang, S., Huang, W.C., Li, P., Guo, H., Poh, S.B., Brady, S.W., Xiong, Y., Tseng, L.M., Li, S.H., Ding, Z., Sahin, A.A., Esteva, F.J., Hortobagyi, G.N., y Yu, D. (2011).
Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* 17, 461-469.
- 30 67. Summy JM, Gallick GE (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 22(4):337-58.
68. Frame MC et al. (2002). v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(4):233-45.
69. Yoo SK et al. (2012) Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish. *J Cell Biol* 199, 225-234.
- 35 70. Tyryshkin A et al., SRC kinase is a novel therapeutic target in lymphangioleiomyomatosis. *Cancer Res*; 74(7) April 1, 2014.
71. Walcher D et al., C-Peptide induces vascular smooth muscle cell proliferation: involvement of SRC-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and extracellular signalregulated kinase 1/2. *Circulation Research.* 2006; 99: 1181-1187.
- 40 72. Cho HM et al., The Src/PLC/PKC/MEK/ERK signaling pathway is involved in aortic smooth muscle cell proliferation induced by glycated LDL. *Molecules and Cells* [2005, 19(1):60-66].
73. Yang K1, Belrose J, Trepanier CH, Lei G, Jackson MF, MacDonald JF. Fyn, a potential target for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011, 27, 243-52.
- 45 74. Nygaard HB, van Dyck CH, Strittmatter SM. Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2014, 6, 8.
75. Kaufman AC1, Salazar SV, Haas LT, Yang J, Kostylev MA, Jeng AT, Robinson SA, Gunther EC, van Dyck CH, Nygaard HB, Strittmatter SM. Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice. *Ann Neurol.* 2015, doi: 10.1002/ana.24394 [ahead of print].
- 50 76. Nygaard HB, Wagner AF, Bowen GS, Good SP, MacAvoy MG, Strittmatter KA, Kaufman AC, Rosenberg BJ, Sekine-Konno T, Varma P, Chen K, Koleske AJ, Reiman EM, Strittmatter SM, van Dyck CH. A phase Ib multiple

ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2015, 7, 35.

77. H. Ma, S. Deacon y K. Horiuchi. The challenge of selecting protein kinase assays for lead discovery optimization. *Expert Opin. Drug Discov.* (2008) 3(6).

5 78. Patton, E. E.; Dhillon, P.; Amatruda, J. F.; Ramakrishnan, L. Spotlight on zebrafish: translational impact. *Dis. Model. Mech.* **2014**, 7, 731-733.

79. Gallardo, V. E.; Varshney, G. K.; Lee, M.; Bupp, S.; Xu, L.; Shinn, P.; Crawford, N. P.; Inglese, J.; Burgess, S. M. Phenotype-driven chemical screening in zebrafish for compounds that inhibit collective cell migration identifies multiple pathways potentially involved in metastatic invasion. *Dis. Model. Mech.* **2015**, 8, 565-576.

10 80. Xiao, T.; Roeser, T.; Staub, W.; Baier H. A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development* **2005**, 132, 2955-2967.

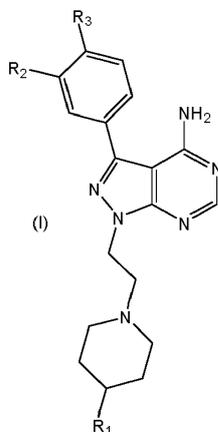
81. Qiu, Z.; Cang, Y.; Goff, S. P. c-Abl tyrosine kinase regulates cardiac growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 1136-1141.

15 82. Chislock, E. M.; Ring, C.; Pendergast, A. M. Abl kinases are required for vascular function, Tie2 expression, and angiotensin-1-mediated survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 12432-12437.

83. Animal experiments were performed under Home Office License in compliance with the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and approved by the University of Edinburgh Ethics Committee.

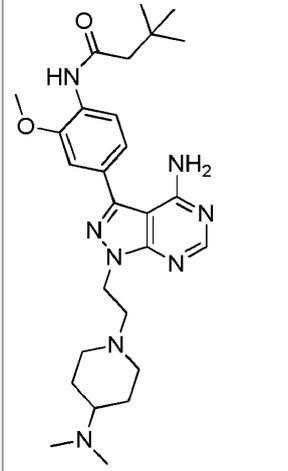
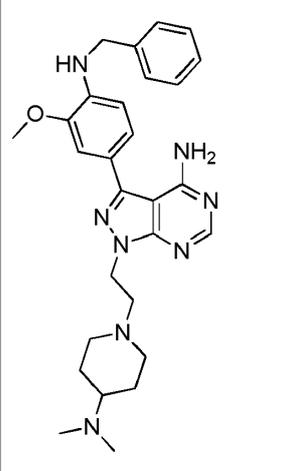
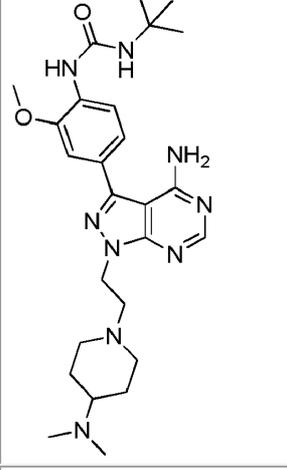
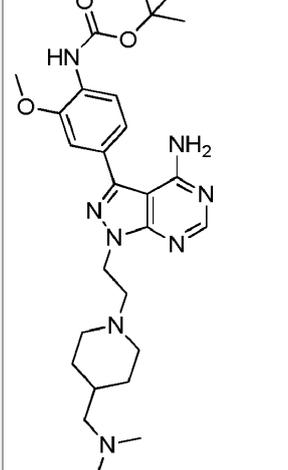
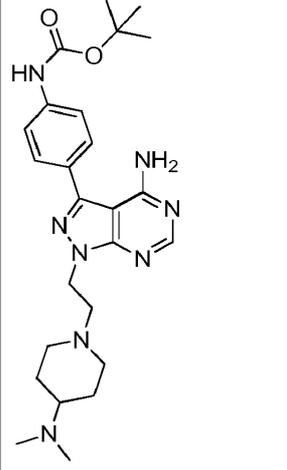
REIVINDICACIONES

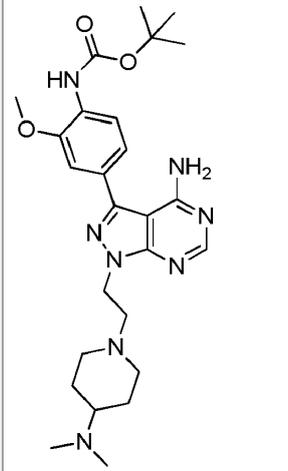
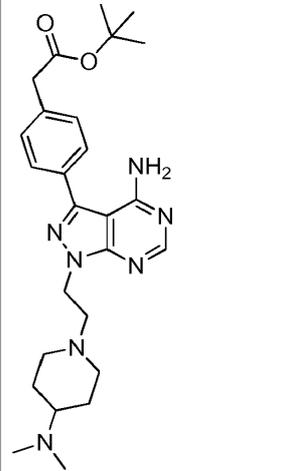
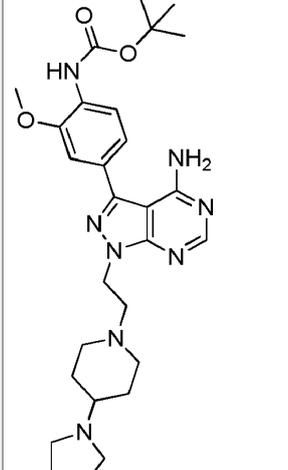
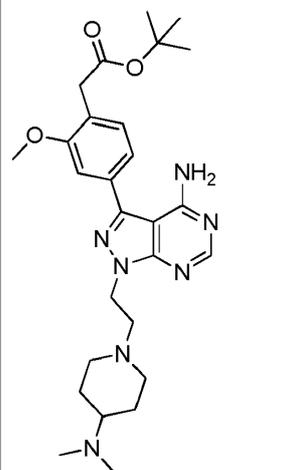
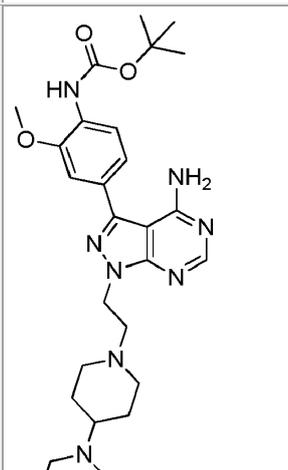
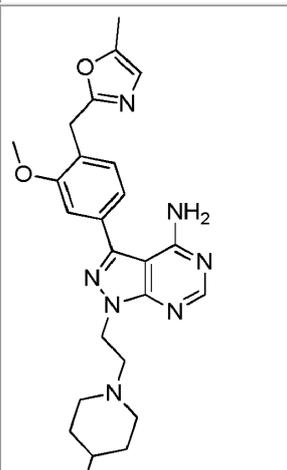
1. Un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este,



en donde:

- 5 R₁ es (CH₂)_mNR₁₁R₁₂;
- R₂ se selecciona de H, halo, OR₁₃, NHR₁₃, alquilo, alquenilo y alquinilo;
- R₃ se selecciona de alquilo, NHCO₂R₄, NHCONR₅R₆, NHCONH-alquilo, NHCOR₇, NH(CH₂)_n-arilo, (CH₂)_p-heteroarilo y (CH₂)_qCO₂R₈, en donde cada resto alquilo, alquenilo, arilo o heteroarilo en la lista mencionada anteriormente está opcionalmente sustituido adicionalmente por uno o más grupos seleccionados de alquilo, halo, OH, NH₂, alcoxi, ariloxi, alquilamino, arilamino, carboxilo y carboxamida;
- 10 R₄ a R₈ y R₁₃ cada uno se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo y arilo;
- R₁₁ y R₁₂ cada uno se selecciona independientemente de alquilo y alquenilo; o R₁₁ y R₁₂ están unidos entre sí con el nitrógeno al que están acoplados para formar un grupo heterocicloalquilo o heterocicloalquenilo;
- n, m, p y q se seleccionan cada uno independientemente de 0, 1 y 2.
- 15 2. Un compuesto según la reivindicación 1 en donde R₁₁ y R₁₂ son alquilo.
3. Un compuesto según la reivindicación 1 en donde R₁₁ y R₁₂ están unidos entre sí con el nitrógeno al que están acoplados para formar un grupo heterocicloalquilo.
4. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente en donde R₁ se selecciona de NMe₂, CH₂NMe₂, pirrolidin-1-ilo y piperidin-1-ilo.
- 20 5. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente en donde R₂ se selecciona de H y alcoxi.
6. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente en donde R₃ se selecciona de NHCO₂-alquilo, NHCO-alquilo, NH(CH₂)_n-arilo, NHCONH-alquilo, (CH₂)_p-heteroarilo y (CH₂)_qCO₂-alquilo.
7. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente en donde R₄ a R₉ son cada uno independientemente alquilo.
- 25 8. Un compuesto según cualquier reivindicación precedente en donde R₃ se selecciona de Me, NHCO₂-^tBu, NHCOCH₂C(Me)₃, NHCH₂fenilo, NHCONH-^tBu, CH₂-(4-metil-oxazol-2-ilo) y CH₂CO₂-^tBu.
9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se selecciona de lo siguiente:

Núm. de compuesto:	Estructura	Núm. de compuesto:	Estructura
526		533	
		540	
503		543	

Núm. de compuesto:	Estructura	Núm. de compuesto:	Estructura
506		553	
518		565	
519		584	

y sales farmacéuticamente aceptables de estos.

10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en medicina.

12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento del cáncer; u

osteoporosis; o un trastorno neurológico; o angiogénesis; o enfermedad pulmonar; o enfermedad ósea metastásica.

13. Un compuesto para usar según la reivindicación 12, en donde el trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer.

5 14. Una combinación que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un agente terapéutico adicional.

15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10 que comprende, además, un segundo agente terapéutico.

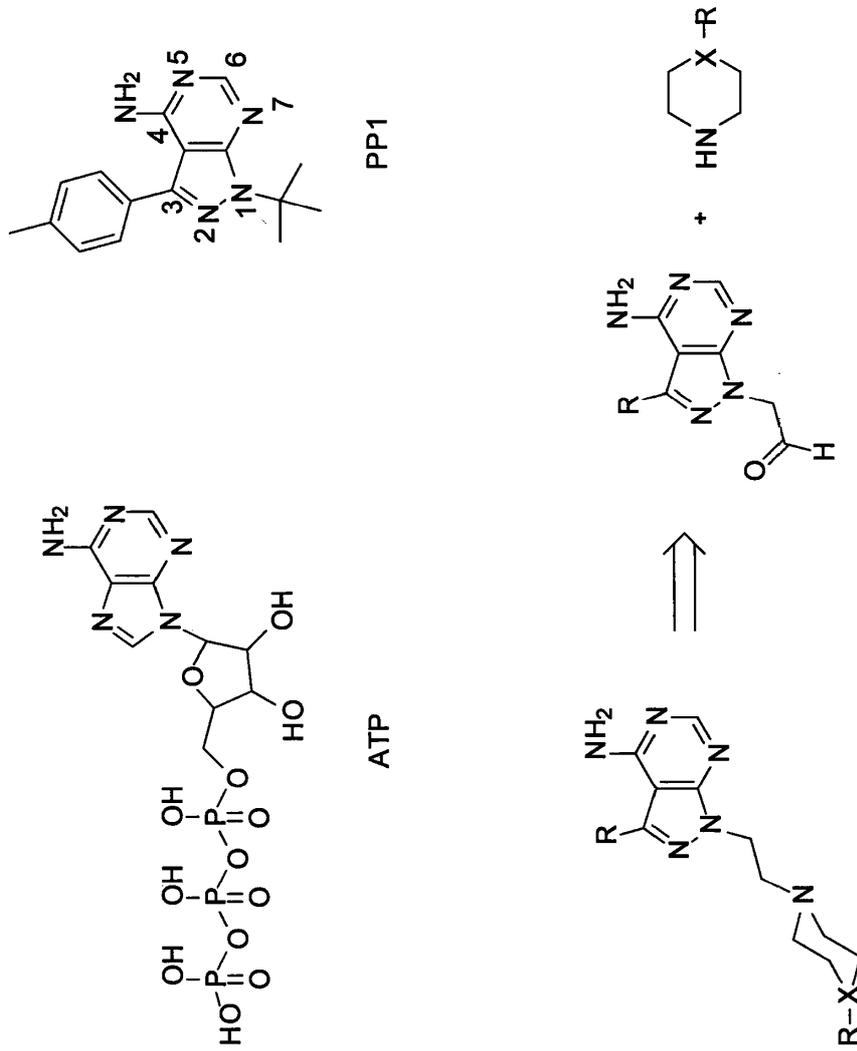


FIG. 1

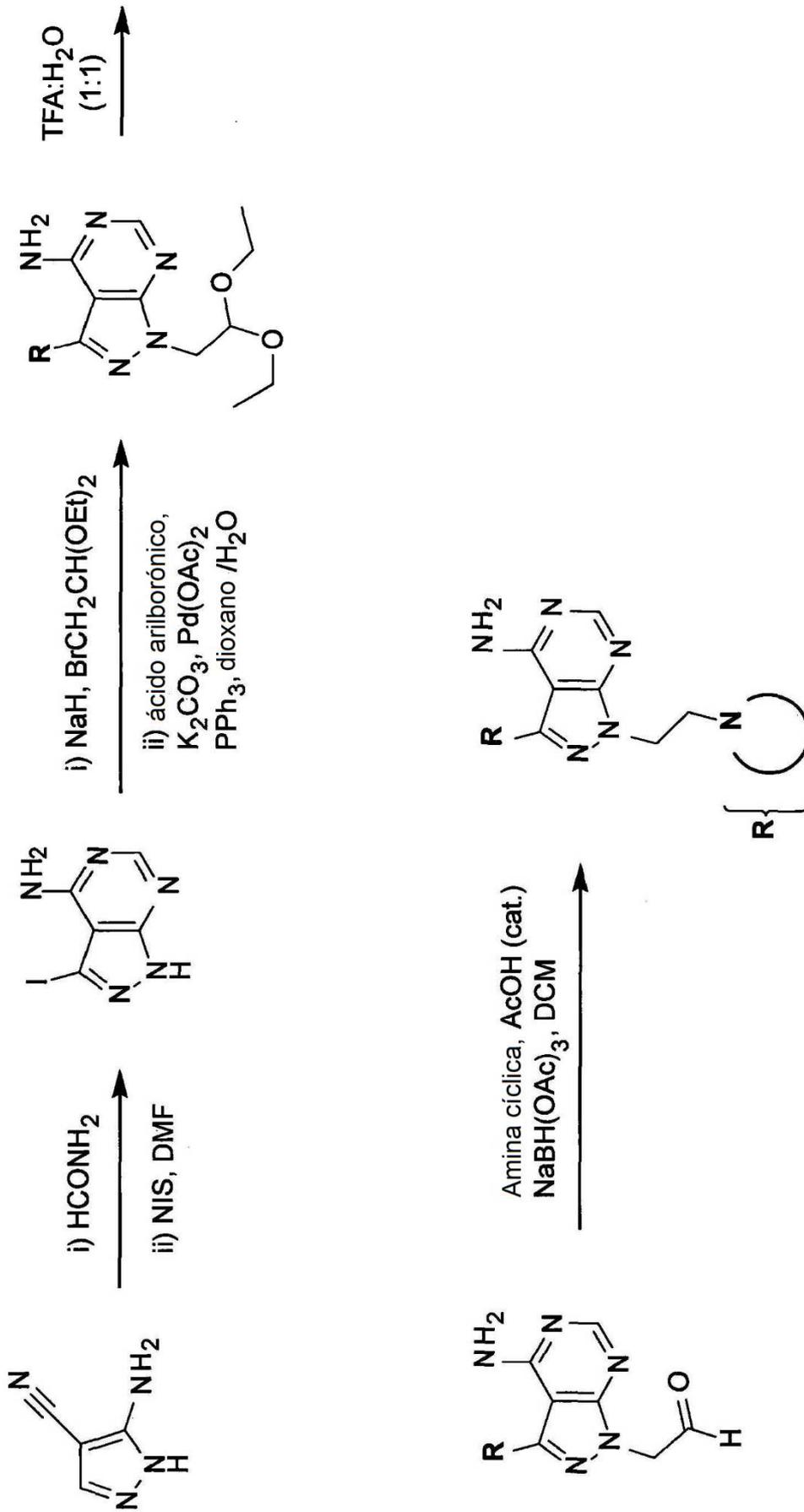


FIG. 2

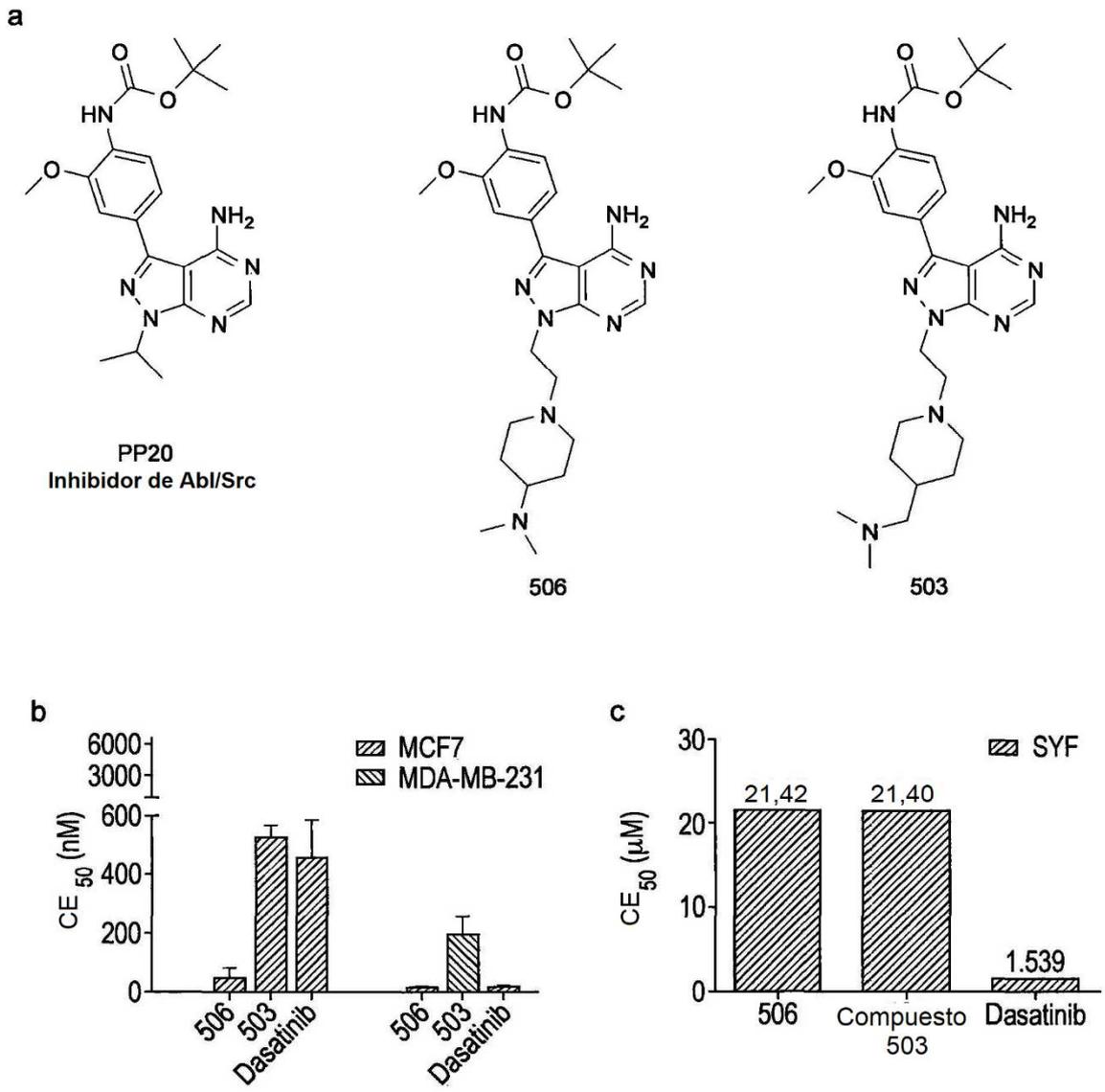


FIG. 3

Compuesto 506

321 ensayos evaluados
21 interacciones mapeadas
Puntuación $S(35) = 0,07$

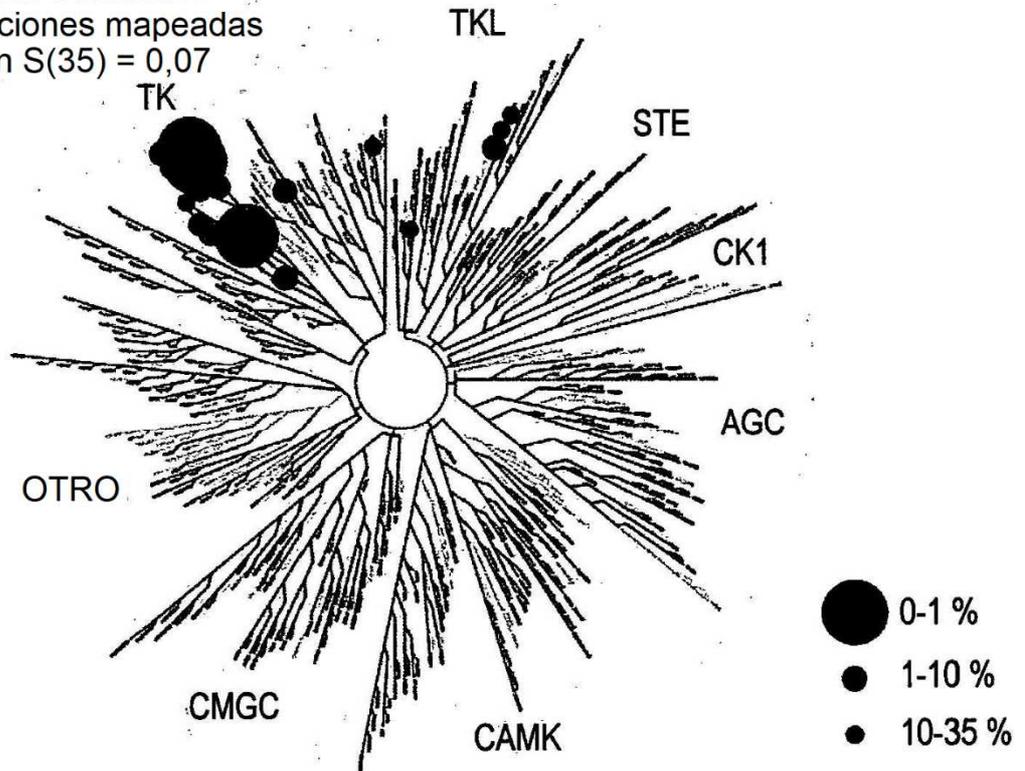


FIG. 4

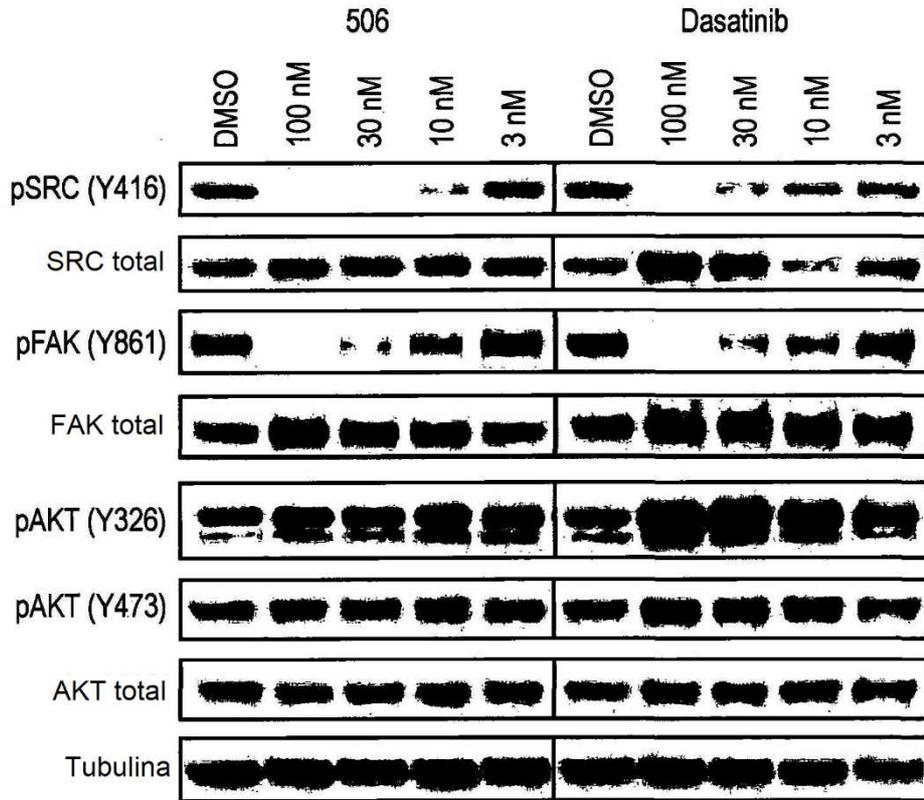


FIG. 5

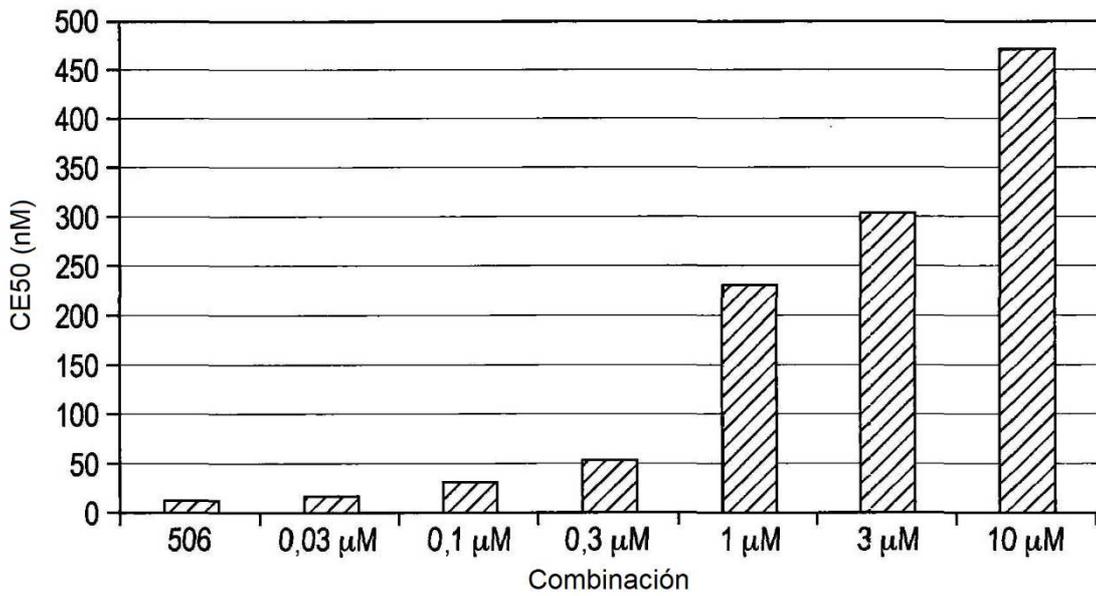


FIG. 6

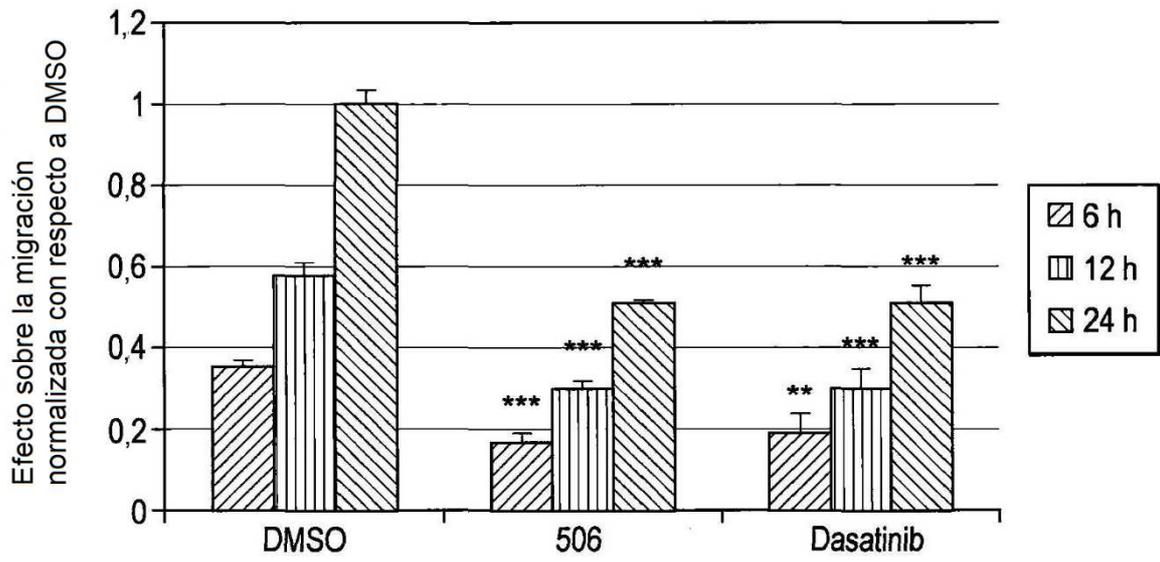


FIG. 7

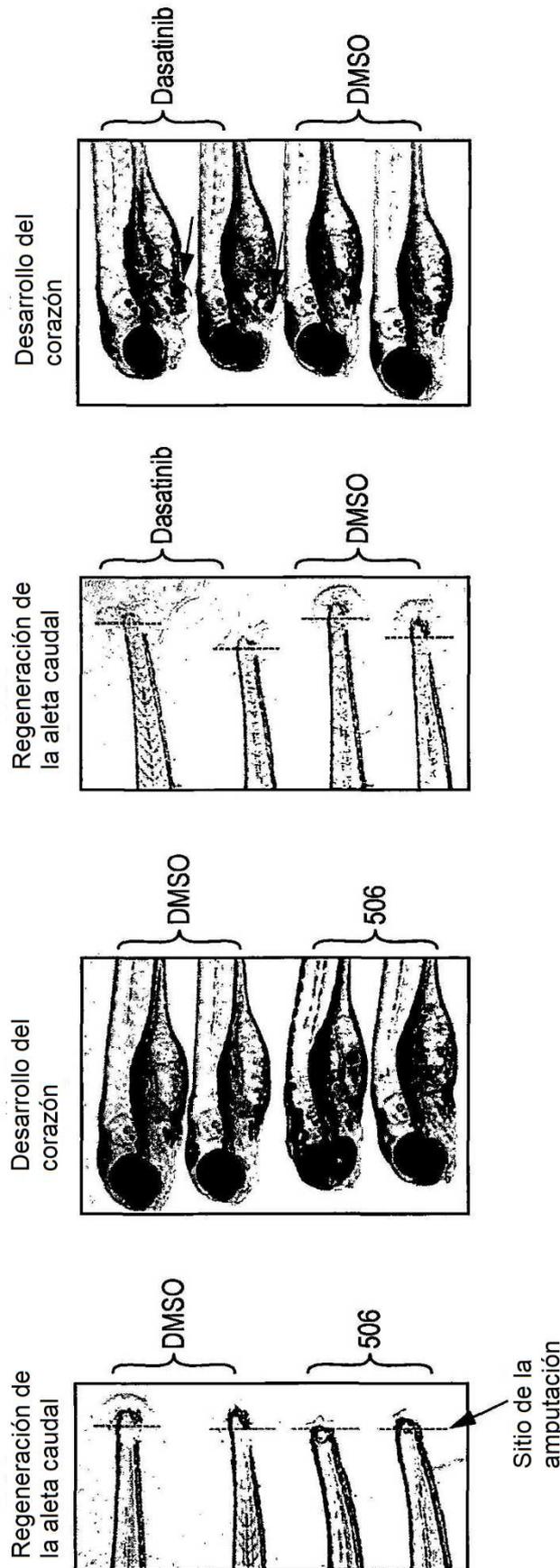


FIG. 8

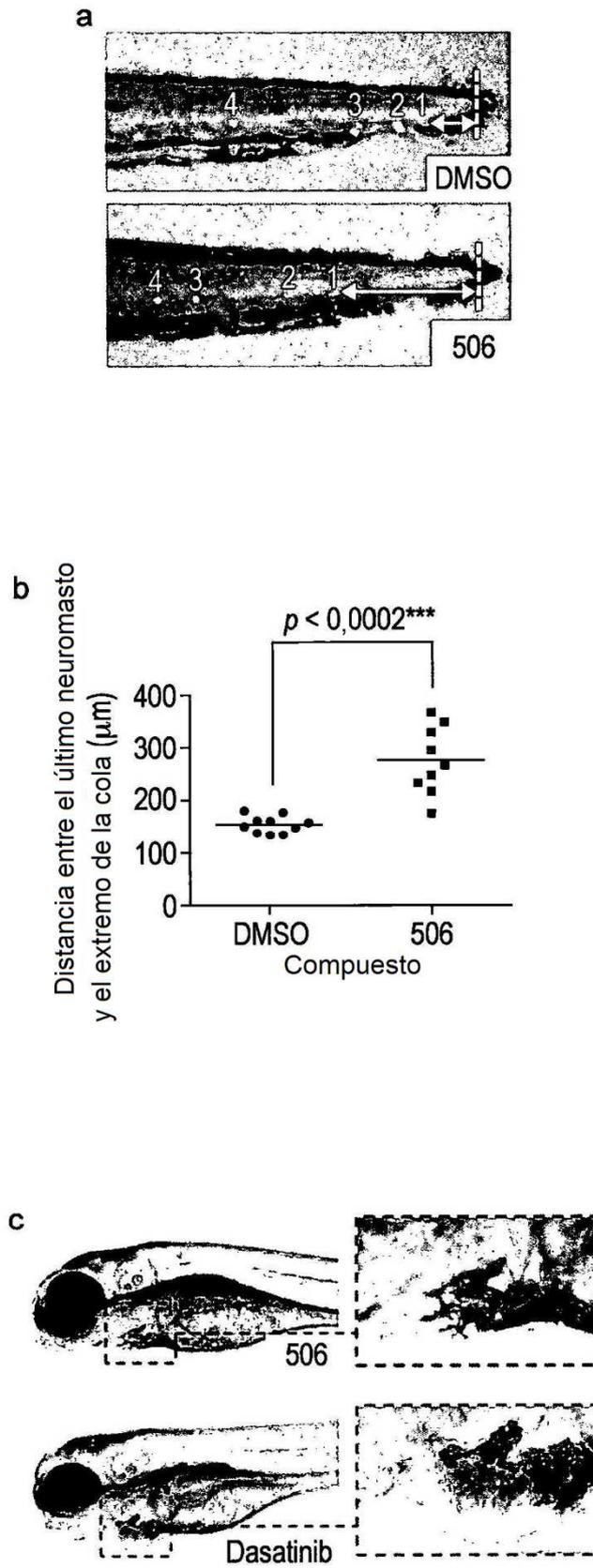


FIG. 9

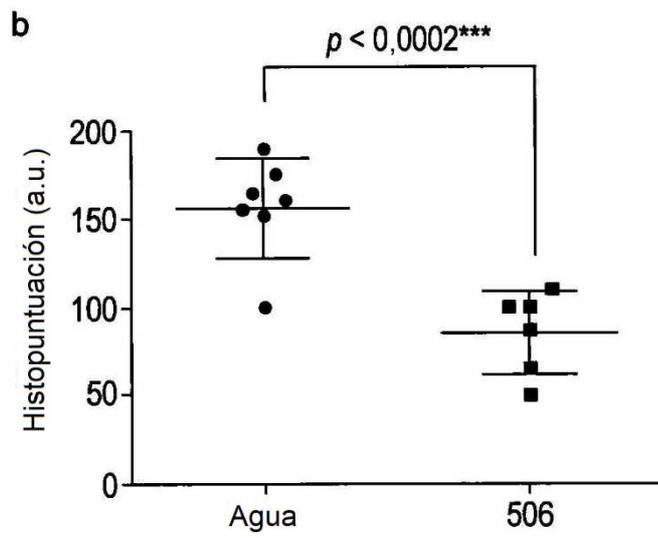
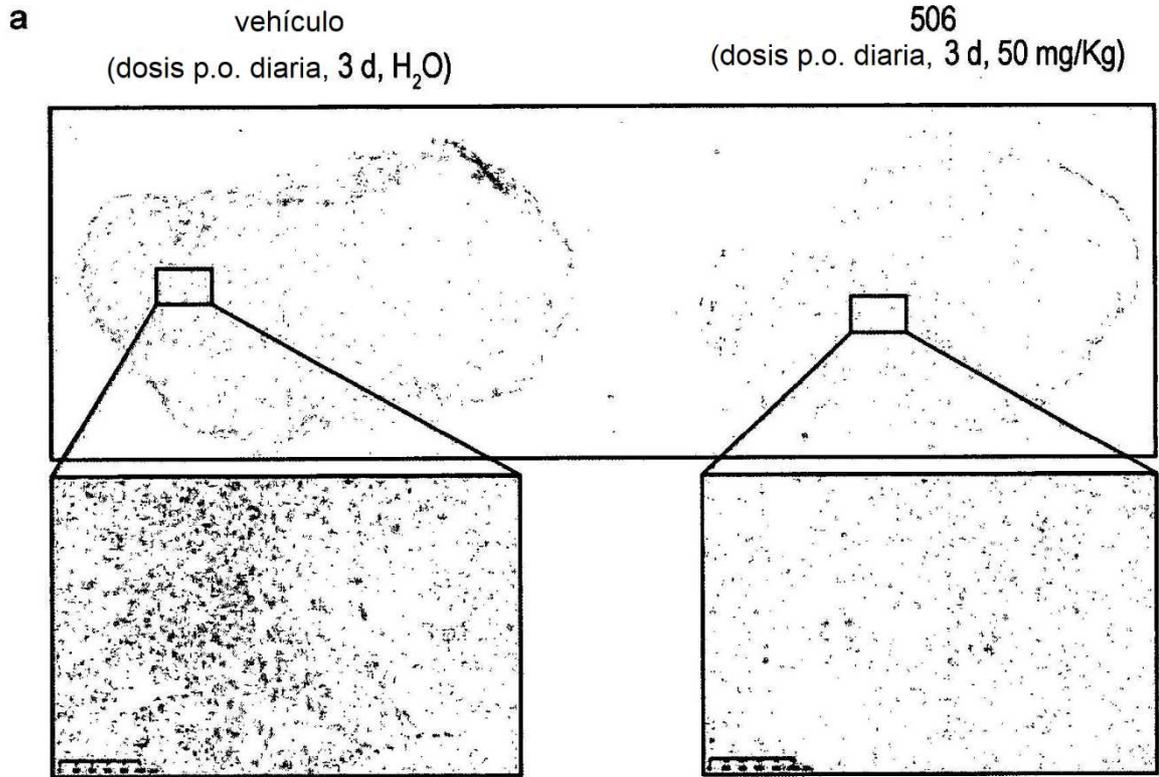


FIG. 10