

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 075**

51 Int. Cl.:

C07D 498/12 (2006.01)
A61K 31/5025 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 498/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 498/16 (2006.01)
C07D 498/22 (2006.01)
C07D 515/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2019** **PCT/CN2019/083644**
87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2019** **WO19206069**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2019** **E 19791600 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024** **EP 3786167**

54 Título: **Compuesto macrocíclico diarílico y composición farmacéutica y uso del mismo**

30 Prioridad:

25.04.2018 CN 201810377811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.11.2024

73 Titular/es:

PRIMEGENE (BEIJING) CO., LTD. (100.0%)
6th Floor, Tower B, Chongxin Building, No. 13
Hangfeng Road, Fengtai District
Beijing 100070, CN

72 Inventor/es:

ZHU, LI;
WU, WEI;
YANG, YANQING y
HU, WEI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 989 075 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

Compuesto macrocíclico diarílico y composición farmacéutica, y uso del mismo

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere al campo farmacéutico, en particular a un compuesto macrocíclico diarílico, a una composición farmacéutica que contiene el compuesto y a uso del mismo.

10 Antecedentes

Las proteínas quinasas son los reguladores clave del crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular. Muchas enfermedades, incluyendo el cáncer, el dolor, las enfermedades del sistema nervioso, las enfermedades autoinmunes y la inflamación, están mediadas por receptores de tirosina quinasas como TRK, ROS 1, ALK, JAK2, SRC, FAK, FYN, LYN, YES, FGR, FAK, ARK5, AXL, etc.

La quinasa del receptor de tirosina neurotrófica (NTRK), o quinasas del receptor de tropomiosina (TRK), pertenece a la familia de las quinasas del receptor de tirosina. Hay tres miembros en la familia NTRK/TRK, NTRK1/TRKA, NTRK2/TRKB y NTRK3/TRKC. Las proteínas de fusión TRK están estrechamente relacionadas con los tumores. Se han encontrado muchas proteínas de fusión, tales como CD74-NTRK1, MPRIP-NTRK1, QKI-NTRK2, ETV6-NTRK3, BTB 1-NTRK3 en una variedad de tumores, tales como cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de tiroides, glioma, etc. Por lo tanto, en los últimos años, la proteína de fusión TRK se está convirtiendo en un objetivo anticancerígeno efectivo y en un foco de investigación. Por ejemplo, WO2010048314 y WO2010033941 han divulgado inhibidores de la quinasa TRK con una estructura de núcleo de pregnano compuesto diferente. Además, las mutaciones diana después de la administración continua del fármaco son una razón importante para la resistencia tumoral, y se han encontrado muchas mutaciones NTRK resistentes en la clínica, como las mutaciones NTRK1 G595R y G667C (Russo M et al. Cancer Discovery, 2016, 6 (1), 36-44), y la mutación NTRK3 G623R (Drilon A. et al., Annals of Oncology, 2016, 27 (5)), 920-926). Por lo tanto, se espera que los inhibidores de TRK de nueva generación resuelvan el problema de la resistencia a los fármacos causada por las mutaciones de NTRK.

Los inhibidores de ALK (quinasa del linfoma anaplásico) han logrado un gran éxito en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón con genes ALK anormales, pero la aparición de resistencia a los fármacos limita el uso clínico a largo plazo de estos medicamentos. Los mecanismos de resistencia a los fármacos incluyen la amplificación de genes diana, mutación de resistencia adquirida, activación de vías de derivación y de corriente abajo, transición epitelial-mesenquimal, metástasis tumoral o similares. Ninguno de los inhibidores de ALK actualmente en el mercado puede superar la resistencia a los fármacos basada en la activación por bypass o la transición epitelial mesenquimal. Es muy urgente desarrollar nuevos inhibidores de ALK que puedan superar simultáneamente la resistencia a múltiples fármacos.

Después del reordenamiento genético, la quinasa ROS1 produce proteínas de fusión activas constitutivas en una variedad de cánceres, como glioblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, colangiocarcinoma, cáncer de ovario, adenocarcinoma gástrico, cáncer colorrectal, tumor miofibroblástico inflamatorio, angiosarcoma y hemangioendotelio epitelioide. La inhibición de la proteína de fusión ROS1 puede inhibir eficazmente los tumores ROS 1 positivos. La FDA ha aprobado varios fármacos nuevos para el NSCLC ALK positivo, pero para los pacientes con NSCLC ROS1 positivo aún no hay muchas opciones excepto Crizotinib, que está aprobado para el tratamiento del NSCLC ROS 1 positivo. Además, ha surgido una resistencia adquirida al fármaco durante el uso clínico de Crizotinib, y los sitios de mutación de resistencia son principalmente ROS1 G2032 y ROS1 L2026M. También existe una necesidad urgente de desarrollar inhibidores de ROS 1 para mutaciones salvajes y resistentes.

Los inhibidores de EGFR han logrado un gran éxito en el tratamiento de pacientes con NSCLC, pero la aparición de resistencia a los fármacos también es un problema muy difícil. En la población resistente a EGFR, se encontró que se sobreexpresaban múltiples vías de señalización, tales como MET, CDCP1, AXL, SHP2. Además, las vías de señalización JAK2/STAT3 y Src-YAP1 también afectan el efecto terapéutico de los inhibidores de EGFR. Se espera que el desarrollo de inhibidores multifuncionales, que puedan actuar sobre JAK2, Src/FAK, AXL o similares, se combine con inhibidores de EGFR para superar la resistencia a los fármacos de las vías de derivación funcionales.

El documento WO 2011/146336 se refiere a compuestos macrocíclicos que inhiben las características de inhibición de la quinasa Trk.

El documento WO 2015/112806 divulga compuestos macrocíclicos para inhibir las proteínas o tirosina quinasas.

65 Compendio

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un compuesto nuevo o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo, que tiene una excelente actividad de inhibición de la tirosina quinasa.

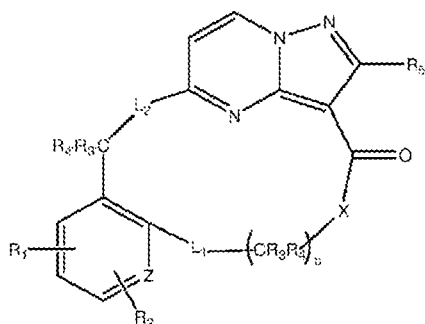
5

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un uso de un compuesto nuevo o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo.

10

La presente divulgación proporciona un compuesto representado por la Fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo,



15

Fórmula (1)

en donde,

20

X se selecciona de -O- o -S-;

L1 se selecciona entre -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)2-, -NR6- o un enlace sencillo;

L2 se selecciona de -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)2- o -NR6-;

25

R1, R2 y R5 se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1-8, un alcoxi C1-8, un haloalquilo C1-8, un cicloalquilo C3-8, un grupo heterocíclico C3-8, un grupo arilo C6-20, un grupo heteroarilo C5-20, hidroxilo, mercapto, carboxilo, grupo éster, acilo, amino, amida, sulfonilo o ciano;

30

los sustituyentes R3 y R4 en cada átomo de C se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1-8, un alcoxi C1-8, un haloalquilo C1-8, un cicloalquilo C3-8, un heterociclilo C3-8, un arilo C6-20, un heteroarilo C5-20, hidroxilo, mercapto, carboxi, grupo éster, acilo, amino, amido, sulfonilo, ciano, o los sustituyentes R3 y R4 junto con el grupo X forman un grupo cicloalquilo de 3-10 miembros, un grupo heterocíclico de 3-10 miembros que contiene al menos un heteroátomo, o un grupo heteroarilo de 5-10 miembros que contiene al menos un heteroátomo; o R3 y R4 son cada uno independientemente un enlace sencillo que conecta el átomo de C y el átomo de anillo macrocíclico adyacente;

35

40

R3 and R4 se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1-8, un alcoxi C1-8, un haloalquilo C1-8, un cicloalquilo C3-8, un heterociclilo C3-8, un arilo C6-20, un heteroarilo C5-20, hidroxilo, mercapto, carboxi, éster, acilo, amino, amido, sulfonilo o ciano;

45

R6 se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1-8, un alcoxi C1-8, un haloalquilo C1-8, un cicloalquilo C3-8, un heterociclilo C3-8, un arilo C6-20, un heteroarilo C5-20, hidroxilo, mercapto, carboxi, éster, acilo, amino, amido, sulfonilo o ciano;

Z representa C o heteroátomo como un átomo de anillo;

50

n representa un número entero de 1 a 10;

los sustituyentes de los grupos mencionados anteriormente pueden seleccionarse de halógeno, un alquilo C1-8, un haloalquilo C1-8, un alcoxi C1-8, un cicloalquilo C3-8, un heterociclilo C3-8, un arilo C6-20, un heteroarilo C5-20, hidroxilo, mercapto, carboxi, éster, acilo, amino, amido, sulfonilo o ciano;

55

los heteroátomos mencionados anteriormente se seleccionan de N, O o S.

Por ejemplo, el átomo de anillo "Z" que se muestra en la fórmula (1) puede representar N.

- 5 En la Fórmula (1), los grupos representados por R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_3' , R_5 , R_6 y los sustituyentes opcionales de los mismos incluyen, si lo permite su definición en la reivindicación:

El hidrógeno puede expresarse como -H, y también puede reemplazarse con isótopos tales como deuterio y tritio.

10

Halógeno puede incluir flúor, cloro, bromo y yodo.

Alquilo C_{1-8} pueden incluir metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, 2-metil-1-propilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-3-butilo, 2,2- dimetil-1-propilo, 2-metil-1-pentilo, 3-metil-1-pentilo, 4-metil-1-pentilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 2,2-dimetil-1-butyl, 3,3-dimetil-1-butyl, 2-etil-1-butyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, terc-butyl, n-pentilo, iso pentilo, neopentilo, terc-pentilo, hexilo, heptilo, octilo, etc.

15

El alcoxi C_{1-8} puede representarse como -Oalquilo C_{1-8} , en donde alquilo C_{1-8} incluye aquellos definidos anteriormente. Por ejemplo, el grupo alcoxi C_{1-8} puede incluir metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, etc.

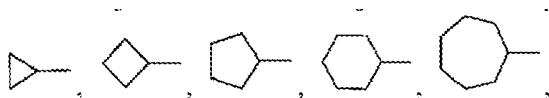
20

El haloalquilo C_{1-8} puede representarse como un grupo en el que cualquier número de átomos de hidrógeno en el grupo alquilo C_{1-8} está sustituido por halógeno, en donde alquilo C_{1-8} y halógeno se definen como anteriormente. Por ejemplo, el haloalquilo C_{1-8} puede incluir $-CF_3$ y similares.

25

El cicloalquilo C_{3-8} puede expresarse como un anillo carbocíclico saturado no aromático, que incluye un anillo de un solo carbono con un anillo) y un anillo de bicarbonato con dos anillos). Por ejemplo, el cicloalquilo C_{3-8} puede incluir

30



o similares.

El grupo heterocíclico C_{3-8} puede representarse como un grupo obtenido reemplazando cualquier número de átomos de anillo en cicloalquilo C_{3-8} con heteroátomos tales como O, S, N, P, Si, etc., en donde cicloalquilo C_{3-8} incluye aquellos definidos anteriormente. Por ejemplo, el grupo heterocíclico C_{3-8} puede incluir oxirano, sulfetano, azaetilo, azetidino, oxbutano, tiburilo, tetrahydrofurano, pirrolidino, oxazolidino, tetrahidropirazolo, pirrolino, dihydrofurano, dihydrotieno, piperidino, tetrahidropirano, tetrahydrotiopirano, morfolino, piperazino, dihydropiridinilo, tetrahidropirano, dihydropirano, tetrahidropirano, dihydrotiopirano, azacicloheptilo, oxacicloheptilo, tiacicloheptilo, oxaaza biciclo[2.2.1]heptilo, azaspiro[3.3]heptilo, etc.

40

El arilo C_{6-20} puede incluir un grupo arilo monocíclico, un grupo arilo bicíclico o un grupo arilo de múltiples anillos. Por ejemplo, puede incluir fenilo, bifenilo, naftilo, fenantrilo, antrilo, azuleno y similares.

El heteroarilo C_{5-20} puede representar un grupo insaturado que contiene cualquier número de heteroátomos tales como O, S, N, P y Si como átomos del anillo. Por ejemplo, los grupos heteroarilo C_{5-20} pueden incluir pirrolilo, furilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, pirazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazolilo, triazolilo, triazinilo, benzofuranilo, benzotienilo, indolilo, isoindolilo, etc.

50

El hidroxilo puede expresarse como -OH.

El mercapto puede representarse como -SH.

El carboxilo puede representarse como -COOH.

55

El grupo éster puede expresarse como -COOR', y la definición de R' puede ser la definición del sustituyente descrito en la fórmula (1). Por ejemplo, un grupo éster sustituido con un grupo alquilo C_{1-8} puede expresarse como -COOCi-s alquilo, donde el grupo alquilo C_{1-8} incluye los grupos definidos anteriormente.

El grupo acilo puede representarse como -COR', y la definición de R' puede ser la definición del sustituyente descrito en la fórmula (1). Por ejemplo, un grupo acilo sustituido con un grupo alquilo C_{1-8} puede representarse como alquilo -COCi-s, donde alquilo C_{1-8} incluye grupos como se definió anteriormente.

60

El grupo amino puede representarse como $-NH_2$, $-NHR'$ o $-N(R')_2$, y la definición de R' puede ser la definición del sustituyente descrito en la fórmula (1). Por ejemplo, un grupo amino sustituido con un grupo alquilo C_{1-8} puede representar alquilo $-NHC_{1-8}$ o $-N(\text{alquilo } C_{1-8})_2$, donde alquilo C_{1-8} incluye grupos como se definió anteriormente.

5

El grupo amida puede representarse como un grupo amino $-CO$, donde el grupo amino se define como anteriormente.

10

El grupo sulfonilo puede representarse como $-S(O)_2R'$, y la definición de R' puede ser la definición del sustituyente descrito en la fórmula (1). Por ejemplo, un grupo sulfonilo sustituido con un grupo alquilo C_{1-8} puede representarse como alquilo $-S(O)_2C_{1-8}$, en donde alquilo C_{1-8} incluye grupos como se definió anteriormente.

El grupo ciano puede representarse como $-CN$.

15

En las definiciones anteriores, cuando cambia el número de átomos de carbono, las definiciones anteriores solo cambian según el cambio en el número de átomos de carbono, y no afectan la definición del tipo de grupo. Por ejemplo, "alquilo C_{1-5} " puede incluir todos los grupos que cumplen un número de átomos de carbono de 1 a 5 en la definición de "alquilo C_{1-8} ", tales como metilo, etilo y n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, etc.

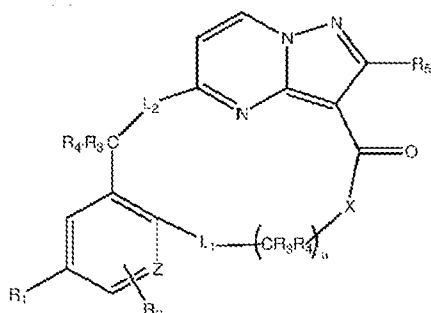
20

Además, en la fórmula anterior (1), los grupos R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 y sus sustituyentes opcionales incluyen, si lo permite su definición en la reivindicación: hidrógeno, deuterio, flúor, cloro, bromo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, $-CN$, $-CF_3$, $-NH_2$, $-NH(\text{alquilo } C_{1-4})$, $-N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$, $-CO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $-CO_2H$, $-NHC(O)$ alquilo C_{1-4} , $-SO_2(\text{alquilo } C_{1-4})$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NH(\text{alquilo } C_{1-4})$, $-C(O)N(\text{alquilo } C_{1-4})_2$, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, pirrolidinilo, pirazolilo, piperidinilo, piridilo, piperazinilo, triazinilo, furanilo, tiofuranilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, fenilo, naftilo, difenilo, terfenilo, etc.

25

En una realización según la presente divulgación, el compuesto está representado por la fórmula (2),

30



Fórmula (2)

35

en donde en la fórmula (2), R_1 se selecciona de flúor o bromo.

En una realización según la presente divulgación, R_2 en la fórmula (1) o la fórmula (2) se selecciona de hidrógeno, flúor o bromo.

40

En una realización según la presente divulgación, L_1 en la fórmula (1) o la fórmula (2) se selecciona de $-O-$, $-S-$ o un enlace sencillo. El enlace sencillo en esta divulgación significa que no hay ningún grupo L_1 , es decir, el C en el $-(CR_3R_4)-$ más alejado del grupo X está conectado directamente al anillo aromático unitario.

En una realización según la presente divulgación, L_2 en la fórmula (1) o la fórmula (2) se selecciona de $-NR_6-$.

45

En una realización según la presente divulgación, n en la fórmula (1) o la fórmula (2) representa un número entero de 2, 3, 4, 5 o 6.

En una realización según la presente divulgación, cuando los sustituyentes R_3 y R_4 en el átomo de C en la fórmula (1) o fórmula (2) junto con el grupo X forman un grupo cicloalquilo, un grupo heterocíclico o un grupo heteroarilo, significa que R_3 o R_4 en el grupo $-(CR_3R_4)-$ adyacente al grupo X junto con el C al que está conectado y el grupo X forma estos grupos.

50

En una realización según la presente divulgación, en la fórmula (1) o la fórmula (2), los sustituyentes R_3 y R_4 en

55

cada átomo de C se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆.

- 5 En una realización según la presente divulgación, en la fórmula (1) o la fórmula (2), R₃ y R₄ se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆.

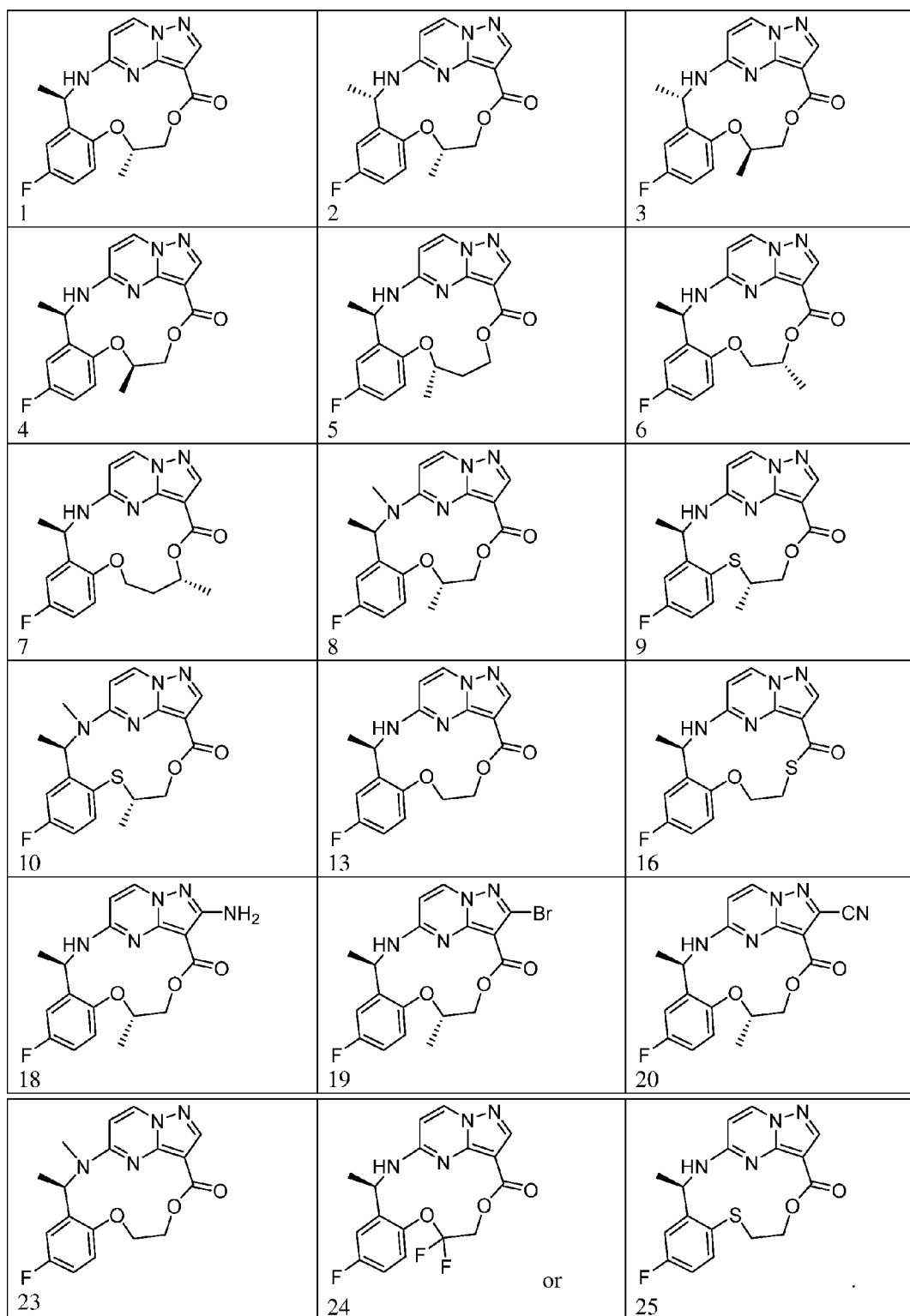
- 10 En una realización según la presente divulgación, en la fórmula (1) o la fórmula (2), el átomo macrocíclico C en el grupo -CR₃R₄- o el grupo -CR₃R₄- o el C en el grupo sustituyente puede crear uno o más centros quirales debido a los diferentes grupos, y la presente divulgación incluye todos los isómeros ópticos y racematos.

- 15 En una realización según la presente divulgación, en la fórmula (1) o la fórmula (2), R₅ se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆, hidroxilo, mercapto, carboxilo, amino o ciano.

- En una realización según la presente divulgación, en la fórmula (1) o la fórmula (2), R₆ se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆.

- 20 En una realización según la presente divulgación, los sustituyentes opcionales en las realizaciones anteriores se seleccionan de flúor, bromo, -CN, -OH, -CF₃, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, -CO₂(alquilo C₁₋₄), -CO₂H, -NHC(O)alquilo C₁₋₄, -SO₂(alquilo C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁₋₄), -C(O)N(alquilo C₁₋₄)₂, un alquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆, un heterociclilo C₃₋₆, un arilo C₆₋₁₀ o un heteroarilo C₅₋₁₀.

- 25 En una realización según la presente divulgación, el compuesto se selecciona de las siguientes estructuras:



La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto descrito en cualquiera de las soluciones técnicas anteriores o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica incluye, pero no se limita a, forma de dosificación oral, forma de dosificación parenteral, forma de dosificación externa, forma de dosificación rectal y similares. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede ser comprimidos orales, cápsulas, píldoras, polvos, preparaciones de liberación sostenida, soluciones y suspensiones, soluciones estériles, suspensiones o emulsiones para inyección parenteral, ungüentos, cremas, geles para uso externo, etc., o supositorios para administración rectal.

La composición farmacéutica también puede incluir otros principios activos o fármacos, que pueden usarse en combinación con el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo.

5

La presente divulgación también proporciona el uso de los compuestos mencionados anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico de los mismos, y la composición farmacéutica mencionada anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar enfermedades mediadas por la tirosina quinasa.

10

Además, la tirosina quinasa se selecciona entre una o más de las siguientes: ALK, ROS 1, TRKA, TRKB, TRKC, JAK2, SRC, FYN, LYN, YES, FGR, FAK, AXL, ARK5.

15

Además, las enfermedades mediadas por la tirosina quinasa incluyen cáncer, dolor, enfermedades neurológicas, enfermedades autoinmunes e inflamación.

20

Además, el cáncer mediado por la tirosina quinasa puede incluir cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer gástrico y esofágico, colangiocarcinoma, glioma, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, tumor miofibroblástico inflamatorio, angiosarcoma, hemangioendotelioma epiteliode, linfoma anaplásico de células grandes, etc.

25

Además, el dolor mediado por la tirosina quinasa puede ser dolor de cualquier origen o causa, incluyendo el dolor por cáncer, dolor por quimioterapia, dolor nervioso, dolor por lesiones u otras fuentes.

30

Además, las enfermedades autoinmunes mediadas por tirosina quinasas incluyen artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, diabetes tipo I, lupus y similares.

Además, las enfermedades neurológicas mediadas por la tirosina quinasa incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington (enfermedad de Huntington) o similares.

35

Además, las enfermedades inflamatorias mediadas por la tirosina quinasa incluyen aterosclerosis, alergias, inflamación causada por infección o lesión y similares.

40

El compuesto macrocíclico diarílico y la composición farmacéutica proporcionados por la presente divulgación tienen una actividad significativa para inhibir la tirosina quinasa, pueden superar la resistencia a los fármacos tumorales y atravesar la barrera hematoencefálica, y también tienen excelentes propiedades farmacocinéticas y una excelente biodisponibilidad de administración oral. Puede administrarse en pequeñas dosis, reduciendo así el coste del tratamiento y los posibles efectos secundarios para el paciente. Por lo tanto, el potencial de aplicación es muy grande.

45

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

Definiciones

50

A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y tecnológicos contenidos en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos en la materia a la que pertenece el objeto de las reivindicaciones. Cuando aparece un nombre comercial en esta divulgación, se refiere a su producto correspondiente o a su principio activo.

55

Debe entenderse que el resumen anterior y la siguiente descripción detallada son ejemplares y solo para explicación, y no imponen ninguna limitación al tema de la presente divulgación. En esta solicitud, debe tenerse en cuenta que, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, la forma singular utilizada en esta especificación y reivindicaciones incluye la forma plural de la cosa a la que se hace referencia. También debe tenerse en cuenta que el uso de "o" y "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el término "comprender" y otras formas como "que comprende", "que contiene" y "que incluye" no son limitativos.

60

Se pueden encontrar definiciones de términos químicos estándar en la literatura, incluyendo Carey y Sundberg, "Advanced Organic Chemistry 4th Ed, Vol A (2000) y B (2001), Plenum Press, Nueva York. A menos que se especifique lo contrario, se aplican métodos convencionales dentro del campo técnico, tales como espectrometría de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, tecnología de ADN recombinante y métodos farmacológicos. A menos que se proporcionen definiciones específicas, aquellos expertos en la materia conocen los términos relacionados y las operaciones y técnicas de laboratorio en química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica utilizadas en esta divulgación. Se pueden utilizar

65

técnicas de referencia para las síntesis químicas, los análisis químicos, la elaboración, formulación y administración de fármacos y el tratamiento de pacientes. Se pueden utilizar técnicas estándares para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos y el cultivo y la transformación de tejidos (tales como electroporación, lipofección). Por ejemplo, se puede utilizar un kit con instrucciones proporcionadas por el fabricante, o las técnicas de reacción y purificación se pueden llevar a cabo según métodos conocidos en la técnica, o según el método descrito en la presente divulgación. Generalmente hablando, las técnicas y etapas antes mencionadas pueden implementarse mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica y descritos en varios documentos generales o documentos más específicos. Estos documentos se describen y citan en la presente divulgación.

Cuando un sustituyente se describe mediante una fórmula química convencional escrita de izquierda a derecha, el sustituyente también incluye sustituyentes químicamente equivalentes obtenidos cuando la fórmula estructural se escribe de derecha a izquierda. Por ejemplo, CH_2O es equivalente a OCH_2 .

El término "sustituido" significa que uno o más átomos de hidrógeno en un átomo específico son reemplazados por un sustituyente, siempre que la valencia del átomo específico sea normal y el compuesto después de la sustitución sea estable. Cuando el sustituyente es oxo (es decir, $=\text{O}$), significa que se reemplazan dos átomos de hidrógeno y el oxo no aparecerá en el grupo aromático.

Cuando cualquier variable (tal como R) aparece más de una vez en la composición o estructura de un compuesto, su definición en cada caso es independiente. Así, por ejemplo, si un grupo se sustituye con 0-2 R, el grupo puede sustituirse opcionalmente con hasta dos R, y R tiene opciones independientes en cada caso. Además, las combinaciones de sustituyentes y/o variantes de los mismos sólo se permiten si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Como se utiliza en este documento, C_{m-n} se refiere a la parte que tiene m-n átomos de carbono. Por ejemplo, el grupo " C_{1-8} " significa que la pieza tiene 1-8 átomos de carbono, es decir, el grupo contiene 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono... 8 átomos de carbono. Por lo tanto, por ejemplo, "alquilo C_{1-8} " se refiere a un alquilo que contiene 1-8 átomos de carbono, es decir, el grupo alquilo se selecciona entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo...octilo, etc. Los intervalos numéricos en este texto, por ejemplo "1-8" se refieren a cada número entero en el intervalo dado. Por ejemplo, "1-8 átomos de carbono" significa que el grupo puede tener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, 4 átomos de carbono, 5 átomos de carbono, 6 átomos de carbono, 7 átomos de carbono u 8 átomos de carbono.

El término "miembro" se refiere al número de átomos esqueléticos que constituyen el anillo. Por ejemplo, la piridina es un anillo de seis miembros y el pirrol es un anillo de cinco miembros.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están dentro del alcance de un juicio médico fiable y son adecuados para su uso en contacto con tejidos humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, reacciones alérgicas u otros problemas o complicaciones de la enfermedad, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable.

El término "composición farmacéutica" se refiere a un compuesto biológicamente activo opcionalmente mezclado con al menos un componente o agente químico farmacéuticamente aceptable. El componente o agente químico farmacéuticamente aceptable es el "vehículo", que ayuda a introducir el compuesto en las células o tejidos. Incluye, pero no se limita a, estabilizadores, diluyentes, agentes de suspensión, espesantes y/o excipientes.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la eficacia biológica del ácido libre y la base libre del compuesto especificado y no tiene efectos adversos en biología u otros aspectos. A menos que se especifique lo contrario, las sales de la presente divulgación pueden incluir sales metálicas, sales de amonio, sales formadas con bases orgánicas, sales formadas con ácidos inorgánicos, sales formadas con ácidos orgánicos, sales formadas con aminoácidos básicos o ácidos, etc. Los ejemplos no limitantes de sales metálicas incluyen, pero no se limitan a, sales de metales alcalinos, tales como sal de sodio, sal de potasio, etc.; sales de metales alcalinotérreos, tales como sal de calcio, sal de magnesio, sal de bario, etc.; sal de aluminio y similares. Ejemplos no limitantes de sales formadas con bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, las sales formadas con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, dicitlohexilamina y similares. Ejemplos no limitantes de sales formadas con ácidos inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, sales formadas con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares. Ejemplos no limitantes de sales formadas con ácidos orgánicos incluyen, pero no se limitan a, sales formadas con ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido málico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, etc. Los ejemplos no limitantes de sales formadas con aminoácidos básicos incluyen, pero no se limitan a, sales formadas con arginina, lisina, ornitina y similares. Ejemplos no limitantes de sales formadas con aminoácidos ácidos incluyen,

pero no se limitan a, sales formadas con ácido aspártico, ácido glutámico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la solicitud se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene un resto ácido o básico por métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se preparan haciendo reaccionar estos compuestos en forma de ácido o base libre con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o disolvente orgánico o una mezcla de ambos. Generalmente, son preferidos medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

El término "solvato" se refiere a un agregado físico formado por un compuesto de la presente divulgación y una o más moléculas de disolvente. Este agregado físico incluye diversos grados de iones y enlaces covalentes, tales como enlaces de hidrógeno. Se ha demostrado que este solvato puede separarse, por ejemplo, cuando una o más moléculas de disolvente se mezclan en la red cristalina. "Solvato" incluye tanto la fase disolvente como el solvato separable. Hay muchos ejemplos de solvatos correspondientes, que incluye solvatos de etanol, solvatos de metanol y similares. "Hidrato" es un solvato que utiliza moléculas de agua (H₂O) como un disolvente. Uno o más compuestos de la presente divulgación pueden prepararse como solvatos a voluntad. La preparación de solvatos es bien conocida. Por ejemplo, M. Caira et al, J. Pharmaceutical Sci., 93(3), 601-611 (2004) describen la preparación de un solvato del fármaco antimicótico fluconazol, es decir, la preparación con acetato de etilo y agua. E.C. van Tonder et al, AAPS PharmSciTech., 5(1), artículo 12 (2004); y AL Bingham et al, Chem. Commun., 603-604 (2001) también describen métodos similares para preparar solvatos e hidratos. Un proceso de preparación típico, no limitante, es disolver el compuesto de la presente divulgación en un disolvente ideal (disolvente orgánico o agua o su disolvente mixto) a una temperatura superior a la temperatura normal, enfriar y dejar cristalizar. Después los cristales se separan mediante métodos estándar. La técnica de análisis por espectroscopia IR puede confirmar la existencia del disolvente (agua) que forma el solvato (hidrato) en el cristal.

El término "metabolito activo" se refiere a un derivado activo del compuesto formado cuando el compuesto se metaboliza.

El término "polimorfos" se refiere a compuestos de la presente divulgación que existen en diferentes formas de red cristalina.

El término "marcador isotópico" se refiere a un compuesto marcado isotópicamente de la presente divulgación. Por ejemplo, los isótopos en el compuesto de la presente divulgación pueden incluir varios isótopos de elementos tales como H, C, N, O, P, F, S, tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶S.

El término "profármaco farmacéuticamente aceptable" o "profármaco" se refiere a cualquier sal, éster, sal de éster u otro derivado farmacéuticamente aceptable del compuesto de la presente divulgación, que puede proporcionar directa o indirectamente el compuesto de la presente divulgación o su metabolito o residuo farmacéuticamente activo después de la administración a un receptor. Los derivados o profármacos particularmente preferidos son aquellos compuestos que pueden mejorar la biodisponibilidad de los compuestos de la presente solicitud cuando se administran a pacientes (por ejemplo, pueden hacer que los compuestos orales se absorban más fácilmente en la sangre) o promover la entrega del compuesto original a los órganos biológicos o al sitio de acción, tales como el cerebro o el sistema linfático. Los grupos funcionales en el compuesto pueden modificarse mediante operaciones convencionales o in vivo de una manera que puede descomponerse en el compuesto original para preparar un profármaco. Diversas formas de profármacos son bien conocidas en la técnica. Véase, Pro-drugs as Novel Delivery Systems (1987) Vol. 14 de la ACS Symposium Series, Bioreversible Carriers in Drug Design, (1987) Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association por T. Higuchi y V. Stella y Pergamon Press, proporcionan discusiones sobre profármacos. Véase Design of Prodrugs, Bundgaard, A. Ed., Elsevier, 1985 y Method in Enzymology, Widder, K. et al., Ed.; Academic, 1985, vol. 42, pág. 309-396; Bundgaard, H. "Design and Application of Prodrugs" en A Textbook of Drug Design and Development, Krosgaard-Larsen y H. Bundgaard, Ed., 1991, Capítulo 5, págs. 113-191; y Bundgaard, H., Advanced Drug Delivery Review, 1992, 8, 1-38.

El término "estereoisómeros" se refiere a isómeros producidos por diferentes disposiciones de átomos en la molécula en el espacio. Los compuestos de la presente divulgación contienen estructuras tales como centros asimétricos o quirales y dobles enlaces. Por lo tanto, los compuestos de la presente divulgación pueden incluir isómeros ópticos, isómeros geométricos, tautómeros, atropisómeros y otros isómeros. Estos isómeros y sus isómeros individuales, racematos, etc. están todos incluidos en el alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, para los isómeros ópticos, los isómeros (R)- y (S)- ópticamente activos y los isómeros D y L pueden prepararse mediante resolución quiral, síntesis quiral o reactivos quirales u otras técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede convertir en diastereómeros al reaccionar con sustancias ópticamente activas apropiadas (tales como alcoholes quirales o cloruro de Mosher), separar y convertir (tales como hidrolizar) en el isómero único correspondiente. Para dar otro ejemplo, también se puede separar mediante una columna cromatográfica.

Las "composiciones farmacéuticas" del presente documento se pueden preparar de una forma conocida en la técnica farmacéutica y se pueden administrar mediante diversas vías, en función de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área que se tratará. Puede administrarse por vía tópica (por ejemplo, transdérmica, cutánea, ocular y mucosa, incluida la administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvo o aerosol, incluso mediante pulverizadores; intratraqueal, intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, como la administración intratecal o intracerebroventricular. Puede administrarse por vía parenteral en una dosis única en bolo o puede administrarse, por ejemplo, mediante una bomba de infusión continua. La composición farmacéutica del presente documento incluye, pero no se limita a, las siguientes formas: comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, bolsitas, sobres, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (sólidos o disueltos en un vehículo líquido); por ejemplo, pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos estériles envasados que contengan hasta un 10% en peso del compuesto activo.

La composición farmacéutica del presente documento puede formularse en una forma de dosificación unitaria, y cada dosificación puede contener aproximadamente de 0,1 a 1000 mg, habitualmente aproximadamente de 5 a 1000 mg de principio activo, y más habitualmente aproximadamente de 100 a 500 mg de principio activo. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad de dosificación única separada físicamente, adecuada para su uso en pacientes humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de sustancia activa mezclada con un soporte farmacéutico adecuado calculado para producir el efecto terapéutico deseado.

El término "individuo" se refiere a un individuo que padece una enfermedad, trastorno o condición, e incluye mamíferos y no mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase Mamíferos: humanos, primates no humanos (tales como chimpancés y otros simios y monos); animales domésticos, tales como vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos; animales domesticados, tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio, incluidos roedores, tales como ratas, ratones y cobayas.

El término "tratamiento" y otros sinónimos similares incluyen alivio, reducción o mejora de los síntomas de una enfermedad o condición, prevención de otros síntomas, mejora o prevención de la causa metabólica subyacente de los síntomas, inhibición de la enfermedad o condición, como prevenir el desarrollo de la enfermedad o condición, aliviar la enfermedad o condición, mejorar una enfermedad o condición, aliviar los síntomas causados por la enfermedad o condición, o detener los síntomas de la enfermedad o condición. Además, el término también puede incluir el propósito de prevención. El término también incluye obtener efectos terapéuticos y/o efectos preventivos. El efecto terapéutico se refiere a curar o mejorar la enfermedad subyacente que se está tratando. Además, la curación o mejora de uno o más síntomas fisiológicos asociados a la enfermedad subyacente también es un efecto terapéutico. Por ejemplo, aunque el paciente todavía pueda estar afectado por la enfermedad subyacente, se observa una mejoría en su condición. En términos de efectos preventivos, la composición o compuesto puede administrarse a pacientes que corren el riesgo de padecer una enfermedad específica, o incluso si no se ha realizado un diagnóstico de la enfermedad, la composición o compuesto puede administrarse a pacientes que presentan uno o más síntomas fisiológicos de la enfermedad.

El término "cantidad para obtener el efecto terapéutico necesario" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de al menos un agente o compuesto suficiente para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o condición que se está tratando después de la administración. El resultado puede ser una reducción y/o alivio de signos, síntomas o causas, o cualquier otro cambio deseado en el sistema biológico. Se pueden utilizar técnicas tales como pruebas de aumento de dosis para determinar la cantidad efectiva adecuada para cada caso individual. La cantidad real de compuesto, composición o agente farmacéutico que debe administrarse suele determinarla el médico según las circunstancias relevantes, incluida la afección que se está tratando, la vía de administración seleccionada, el compuesto real administrado; la edad, el peso y la respuesta de cada paciente; y la gravedad de los síntomas del paciente, etc.

La proporción o concentración del compuesto de la presente divulgación en la composición farmacéutica puede no ser fija, dependiendo de varios factores, incluyendo la dosis, las propiedades químicas (por ejemplo, hidrofobicidad), la vía de administración y similares. Por ejemplo, el compuesto de la presente divulgación puede proporcionarse mediante una solución acuosa fisiológicamente tamponada que contenga aproximadamente 0,1-10% p/v del compuesto para administración parenteral. Algunas dosis típicas varían entre aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal/día. En ciertas realizaciones, la dosis varía entre aproximadamente de 0,01 mg/kg y aproximadamente de 100 mg/kg de peso corporal/día. La dosis probablemente dependa de variables, tales como el tipo y el grado de desarrollo de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración.

El término "administración" se refiere a un método capaz de administrar un compuesto o composición a un sitio deseado para su acción biológica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, vías orales, vías transduodenales, inyecciones parenterales (incluyendo inyección o infusión intravenosa, subcutánea,

intraperitoneal, intramuscular e intraarterial), administración tópica y rectal. Aquellos expertos en la materia están familiarizados con las técnicas de administración que se pueden utilizar para los compuestos y métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, los analizados en Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edición actual; Pergamon; y Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (edición actual), Mack Publishing Co., Easton, Pa.

El término "Cl₅₀" se refiere a una inhibición del 50% del efecto máximo obtenido en un análisis que mide dicho efecto.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de la ruta sintética del Ejemplo 1.

Descripción Detallada

Para hacer más claros los objetivos, las soluciones técnicas y las ventajas de la presente divulgación, a continuación se describirán con más detalle las soluciones técnicas de las realizaciones ejemplares de la presente divulgación.

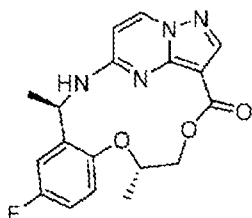
En la presente divulgación, los compuestos descritos en la presente divulgación pueden prepararse mediante los siguientes métodos. Los siguientes métodos y ejemplos sirven para ilustrar estos métodos. Los compuestos descritos en el presente documento también pueden sintetizarse utilizando técnicas de síntesis estándar conocidas por los expertos en la materia, o pueden utilizarse métodos conocidos en la materia y métodos descritos en el presente documento en combinación.

Las reacciones químicas en las realizaciones de la presente divulgación se completan en un disolvente adecuado, y el disolvente debe ser adecuado para los cambios químicos de la presente divulgación y los reactivos y materiales requeridos. Para obtener los compuestos de la presente divulgación, a veces es necesario que los expertos en la materia modifiquen o seleccionen las etapas de síntesis o los esquemas de reacción basándose en las realizaciones existentes.

Una consideración importante en la planificación de cualquier ruta sintética en la técnica es seleccionar un grupo protector apropiado para el grupo funcional reactivo (tal como el grupo amino en la presente divulgación). Para los profesionales capacitados, Greene y Wuts (*Protective Groups In Organic Synthesis*, Wiley and Sons, 1991) es la autoridad a este respecto.

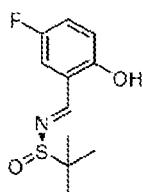
Las reacciones descritas en el presente documento pueden controlarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos puede controlarse mediante un método de amplio espectro, tal como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (tales como ¹H o ¹³C), la espectroscopia infrarroja, la espectrofotometría (I como la luz UV-visible), la espectrometría de masas, etc., o la cromatografía, tal como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía en capa fina.

Ejemplo 1: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



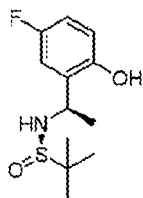
La ruta sintética se muestra en la Figura 1.

Etapas A: (R, E)-N-(5-fluoro-2-hidroxibencilideno)-2-metilpropano-2-sulfinamida



Se añadieron 5,8 g (41,4 mmol, 1,0 eq) de 5-fluoro-2-hidroxibenzaldehído y 5,0 g (41,4 mmol, 1 eq) de (R)-2-metilpropano-2-sulfonamida a 100 mL de cloruro de metileno (DCM), y después se añadieron 21,5 g (66,3 mmol, 1,6 eq) de Cs₂CO₃ bajo agitación magnética. La solución resultante se agitó a ta durante la noche. La mezcla se filtró y la torta del filtro se enjuagó con diclorometano. El filtrado se concentró para dar el producto bruto, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional (8,5 g, rendimiento del 85 %).

Etapa B: (R)-N-((R)-1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)-2-metilpropano-2-sulfonamida



10

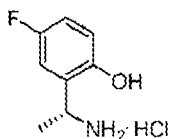
Se añadieron 24 g (100 mmol, 1,0 eq) de (R,E)-N-(5-fluoro-2-hidroxibencilideno)-2-metilpropano-2-sulfonamida a 300 mL de THF y la mezcla se enfrió a -65°C, se añadieron lentamente 100 mL (3 N, 3,0 eq) de bromuro de metilmagnesio bajo N₂ y la temperatura se mantuvo por debajo de -50°C. Después de añadir, la mezcla se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente durante la noche. El análisis mediante TLC (CH₂Cl₂:hexano=3:1) mostró que la reacción se completó. La mezcla de reacción se extinguió con agua (500 mL). Se añadieron 500 mL de acetato de etilo (EA) para la extracción. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera sucesivamente, y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó por concentración para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (8,5 g, rendimiento del 33 %).

20

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,02 (s, 1H), 6,79 (d, J = 34,0 Hz, 1H), 6,65-6,51 (m, 1H), 6,50-6,41 (m, 1H), 5,04 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,45-4,30 (m, 1H), 1,53 (d, J = 8,0 Hz, 3H), 1,29 (s, 9H).

Etapa C: clorhidrato de (R)-2-(1-aminoetil)-4-fluorofenol

25

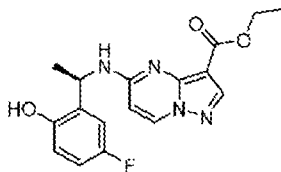


30

Se disolvieron 8,5 g (32,8 mmol, 1,0 eq) de (R)-N-((R)-1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)-2-metilpropano-2-sulfonamida en 100 mL de solución de cloruro de hidrógeno dioxano (4 N). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 3 horas y el análisis mediante TLC mostró que la reacción se completó. El disolvente se eliminó por concentración. El producto bruto se disolvió en 100 mL de EA, se filtró y se enjuagó con EA. El sólido se recogió y se secó para obtener el producto objetivo (5,4 g, rendimiento del 87 %).

Etapa D: (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo

35



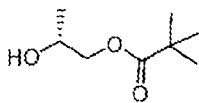
40

Se disolvieron 5,3 g (27,9 mmol, 1,0 eq) de clorhidrato de (R)-2-(1-aminoetil)-4-fluorofenol, 6,29 g (27,9 mmol, 1,0 eq) de 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo y diisopropiletilamina (DIEA) (12 mL, 167 mmol, 6,0 eq) en 60 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). La mezcla se calentó a 120 °C durante 5 horas. El análisis mediante TLC mostró que la reacción se completó y el disolvente se eliminó por concentración. Se añadieron agua (100 mL) y acetato de etilo (200 mL) para la extracción. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera sucesivamente, y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó por concentración para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (2,9 g, rendimiento del 31 %).

45

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 9,17 (brs, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,14 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,93-6,90 (m, 2H), 6,83 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,81 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,64 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 4,42 (q, J = 8,0 Hz, 2H), 1,61 (d, J = 8,0 Hz, 3H), 1,41 (t, 3H).

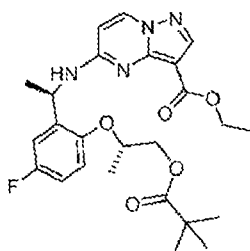
50

Etapla E: (R)-2-hidroxipropil pivalato

- 5 A una solución de (R)-propano-1,2-diol (7,6 g, 100 mmol, 1,0 eq) y piridina (16 mL, 200 mmol, 2,0 eq) en 80 mL de diclorometano (DCM) se añadió lentamente cloruro de pivaloilo (12,6 g, 100 mmol, 1,0 eq) en un baño de hielo. Después de añadirlo, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. El análisis mediante TLC mostró que la reacción se completó y el disolvente se eliminó por concentración. Se añadieron agua (100mL) y acetato de etilo (250mL) para la extracción. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera sucesivamente, y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó por concentración para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10,5 g, rendimiento del 66 %).

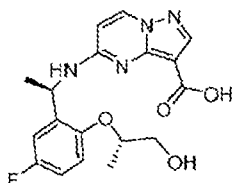
Etapla F: Compuesto 11

15



- 20 A una solución de (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de (R)-etilo (2,0 g, 5,8 mmol, 1,0 eq), pivalato de (R)-2-hidroxipropilo (1,39 g, 8,7 mmol, 1,5 eq) y PPh₃ (3,04 g, 11,6 mmol, 2,0 eq) en DCM (35 mL) se añadió lentamente azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) (2,02 g, 11,6 mmol, 2,0 eq) en un baño de hielo. Después de añadirlo, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. El análisis mediante TLC mostró que la reacción se completó y el disolvente se eliminó por concentración. Se añadieron agua (100mL) y acetato de etilo (250mL) para la extracción. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con agua y salmuera sucesivamente, y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro.
- 25 El disolvente se eliminó por concentración para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (2,1 g, rendimiento del 75 %).

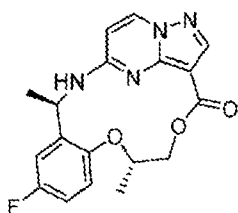
- 30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,25(s, 1H), 8,16 (d, J = 8,0Hz, 1H), 7,10(d, J = 8,0Hz, 1H), 6,90(d, J = 8,0Hz, 2H), 6,08 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,24 (s, 1H), 4,74-4,65 (m, 1H), 4,38 (q, J = 8,0 Hz, 2H), 4,28-4,13 (m, 3H), 1,56(d, J = 8,0 Hz, 3H), 1,40(t, J = 8,0 Hz, 3H), 1,25(d, J = 8,0 Hz, 3H), 1,20 (t, 9H).

Etapla G: Compuesto 12

- 35 A una solución del compuesto 11 (1,5 g, 3,1 mmol, 1,0 eq) en MeOH (10 mL) se añadió una solución de NaOH (3,1 mL, 10 N, 10,0 eq) en un baño de hielo. Después de añadirlo, la mezcla se calentó a temperatura ambiente durante 2,0 horas. El análisis mediante TLC mostró que la reacción se había completado y la solución se eliminó por concentración. Se añadió solución de HCl 1 N hasta pH 7. La suspensión resultante se recogió por filtración y se lavó con 200 mL de agua. El producto bruto se secó para obtener el compuesto objetivo 12 (0,72 g, rendimiento del 63%).
- 40

- 45 ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ 11,50 (s, 1H), 8,55 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 8,28 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,15-6,94 (m, 3H), 6,45 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 5,61 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,52-4,35 (m, 1H), 3,68-3,42 (m, 2H), 1,43 (d, J = 8,0 Hz, 3H), 1,24 (d, J = 8,0 Hz, 3H).

Etapla H: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonaftan-9-ona

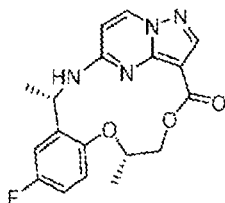


A una solución del compuesto 12 (150 mg, 0,40 mmol, 1,0 eq), cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (489 mg, 2,0 mmol, 5,0 eq) en 10 mL de THF se añadió Et₃N (280 mg, 2,4 mmol, 6,0 eq), la solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Después, la solución de reacción se añadió lentamente a una solución de 4-dimetilaminopiridina (488 mg, 4,0 mmol, 10,0 eq) en 500 mL de tolueno. La mezcla resultante se calentó a 100°C bajo agitación durante 2 horas, después la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El análisis mediante TLC mostró que la reacción se completó y el disolvente se eliminó por concentración y se añadió agua (30 mL) y EA (50 mL) para la extracción. Las capas orgánicas se lavaron dos veces con agua y salmuera. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó por concentración para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (23 mg, rendimiento del 16 %).

CL-MS: m/z = 357 [M+H]⁺.

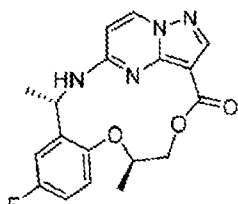
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,26-8,20 (m, 2H), 7,01 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,87-6,69(m, 2H), 6,19 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 6,01-5,85 (m, 1H), 5,55 (s, 1H), 4,89 (dd, J = 8,0, 4,0 Hz, 1H), 4,62(s, 1H), 4,13(t, J = 8,0 Hz, 1H), 1,63-1,52(m, 6H).

Ejemplo 2: (1³E,1⁴E,3S,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a] pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



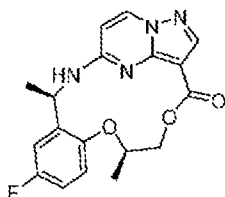
El compuesto (20 mg, 15 %) se preparó según las etapas descritas en el ejemplo 1. CL-MS: m/z = 357 [M+H]⁺.

Ejemplo 3: (1³E,1⁴E,3S,6R)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



El compuesto (31 mg, 22 %) se preparó siguiendo las etapas descritas en el ejemplo 1. CL-MS: m/z = 357 [M+H]⁺.

Ejemplo 4: (1³E,1⁴E,3R,6R)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



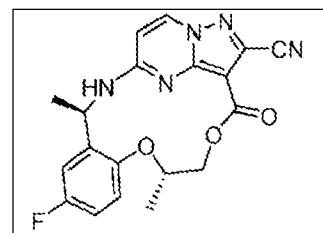
El compuesto (35 mg, 24 %) se preparó siguiendo las etapas descritas en el ejemplo 1. CL-MS: m/z = 357

[M+H]⁺.

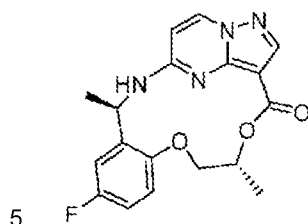
Los siguientes compuestos se prepararon mediante un método similar según el ejemplo 1:

Ejemplo 5: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,9-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-10-ona	
Ejemplo 7: (1³E,1⁴E,3R,8R)-4⁵-fluoro-3,8-dimetil-5,9-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-10-ona	
Ejemplo 8: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-2,3,6-trimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-9-ona	
Ejemplo 10: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-2,3,6-trimetil-8-oxa-5-tia-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-9-ona	
Ejemplo 16: (R,1³E,1⁴E)-4⁵-fluoro-3-metil-5-oxa-8-tia-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-9-ona	
Ejemplo 18: (1³E,1⁴E,3R,6S)-1²-amino-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-9-ona	
Ejemplo 19: (1³Z,1⁴E,3R,6S)-1²-bromo-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclodecafán-9-ona	
Ejemplo 20:	

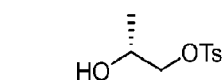
(1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-9-oxo-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoafano-12-carbonitrilo



Ejemplo 6: (1³E,1⁴E,3R,7R)-4⁵-fluoro-3,7-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoafano-9-ona



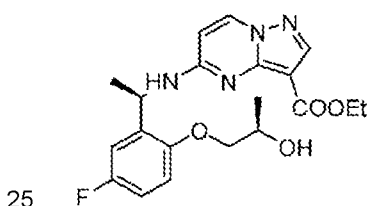
Etapas A: (R)-2-hidroxiopropil 4-metilbencenosulfonato



A una solución de (R)-propano-1,2-diol (2,08 g, 27,3 mmol, 1,0 eq) y Et₃N (8,3 g, 81,9 mmol, 3,0 eq) en 40 mL de CH₂Cl₂, se añadió lentamente cloruro de 4-metilbencenosulfonilo (5,2 g, 27,34 mmol, 1,0 eq) a temperatura ambiente. Se añadió cantidad catalítica de DMAP. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de añadir agua, el producto se extrajo tres veces con CH₂Cl₂ y se lavó una vez con salmuera. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (2,1 g, rendimiento del 33 %).

¹H RMN(400 MHz, CDCl₃) δ 7,85 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,40 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,16-3,98 (m, 2H), 3,92-3,87 (m, 1H), 2,50 (s, 3H), 1,20 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

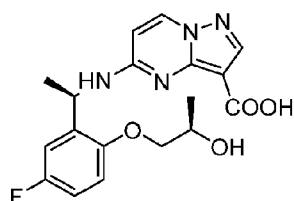
Etapas B: 5-(((R)-1-(5-fluoro-2-((R)-2-hidroxiopropoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo



A una solución de (R)-5-(((R)-1-(5-fluoro-2-((R)-2-hidroxiopropoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo (680 mg, 1,97 mmol, 1,0 eq) en DMF, se añadió sucesivamente K₂CO₃ (1,36 g, 9,85 mmol, 5,0 eq) y (R)-2-hidroxiopropil 4-metilbencenosulfonato (500 mg, 2,17 mmol, 1,1 eq). Después de la adición, la mezcla de reacción se calentó a 80 °C en un baño de aceite durante 4 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se detuvo con agua y el producto se extrajo tres veces con EA. Las fases orgánicas combinadas se lavaron tres veces con agua, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (278 mg, rendimiento del 35 %). CL-MS: m/z = 403 [M+H]⁺.

CL-MS: m/z = 403 [M+H]⁺.

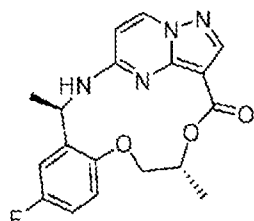
Etapas C: Ácido 5-(((R)-1-(5-fluoro-2-((R)-2-hidroxiopropoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxílico



Procedimiento al que se hace referencia en la etapa C del ejemplo 13.

5 CL-MS: $m/z = 375 [M+H]^+$.

Etapas D: (1³E,1⁴E,3R,7R)-4⁵-fluoro-3,7-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



10

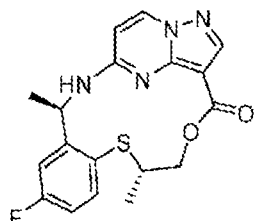
Procedimiento referido a la etapa D del ejemplo 13.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,24 (s, 1H), 8,18 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,88-6,86 (m, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,17-6,15 (m, 2H), 5,62 (s, 1H), 5,52 (s, 1H), 4,37 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 4,08 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 1,71 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 1,57 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H). CL-MS: $m/z = 357 [M+H]^+$.

15

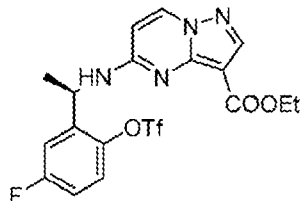
Ejemplo 9: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-8-oxa-5-tia-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona

20



Etapas A: (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(((trifluorometil)sulfonil)oxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo

25



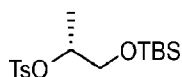
A una solución de (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo en CH₂Cl₂ en un baño de hielo, se añadieron lentamente sucesivamente piridina (489 mg, 3,18 mmol, 3,0 eq) y anhídrido trifluorometanosulfónico (872 mg, 3,09 mmol, 1,5 eq). La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de añadir agua, el producto se extrajo tres veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (785 mg, rendimiento del 80 %).

30

35

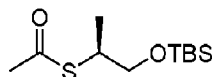
CL-MS: $m/z = 477 [M+H]^+$.

Etapas B: (R)-1-((terc-butildimetilsilil)oxi)propan-2-ilo 4-metilbencenosulfonato



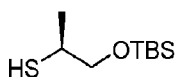
Procedimiento al que se hace referencia en la etapa A del ejemplo 6.

5 Etapa C: (S)-S-(1-((tert-butildimetilsilil)oxi)propan-2-il)etanotioato



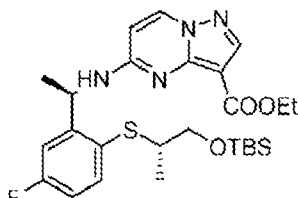
10 A una solución de 4-metilbencenosulfonato de (R)-1-((tert-butildimetilsilil)oxi)propan-2-ilo (2,0 g, 5,8 mmol, 1,0 eq) en DMF, se añadió lentamente etanotioato de potasio (796 mg, 6,96 mmol, 1,2 eq). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C en un baño de aceite durante 4 horas. Después de enfriar a TA, se añadió agua. El producto fue extraído tres veces con EA. Las fases orgánicas combinadas se lavaron tres veces con agua, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (1,0 mg, rendimiento del 69 %).

15 Etapa D: (S)-1-((tert-butildimetilsilil)oxi)propano-2-tiol



20 A una solución de (S)-S-(1-((tert-butildimetilsilil)oxi)propan-2-il)etanotioato (1,0 g, 4,02 mmol, 1,0 eq) en MeOH/H₂O (5:1), se añadió lentamente NaOH (241 mg, 6,03 mmol, 1,5 eq) bajo un baño de hielo. La reacción se agitó durante 0,5 horas más. Se eliminó el MeOH mediante destilación al vacío y el producto se extrajo tres veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (700 mg, rendimiento del 84 %).

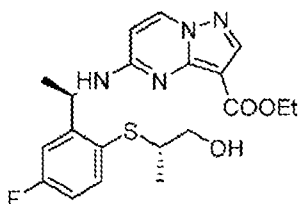
Etapa E: 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((tert-butildimetilsilil)oxi)propan-2-il)tio)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo



30 A una solución de (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(((trifluorometil)sulfonyl)oxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo (646 mg, 1,35 mmol, 1,0 eq) en 1,4-dioxano, se añadieron (S)-1-((tert-butildimetilsilil)oxi)propano-2-tiol (700 mg, 3,39 mmol, 2,5 eq), Xantphos (156 mg, 0,27 mmol, 0,2 eq), DIEA (1,3 mL, 8,1 mmol, 6,0 eq) y Pd₂(dba)₃ (124 mg, 0,135 mmol, 0,1 eq). Se reemplazó 3 veces con N₂ y se calentó a 120 °C durante la noche mediante un baño de aceite. Después de enfriar a TA, se añadió agua. El producto se extrajo 3 veces con EA. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (390 g, rendimiento del 54 %).

40 CL-MS: m/z = 533 [M+H]⁺.

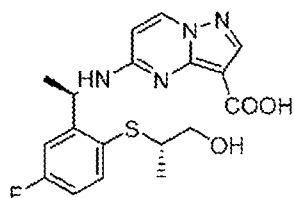
Etapa F: 5-(((R)-1-(5-fluoro-2-(((S)-1-hidroxipropan-2-il)tio)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo



Procedimiento al que se hace referencia en la etapa B del ejemplo 13.

CL-MS: $m/z = 419 [M+H]^+$.

5 **Etapla G: Ácido 5-(((R)-1-(5-fluoro-2-(((S)-1-hidroxipropan-2-il)tio)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxílico**



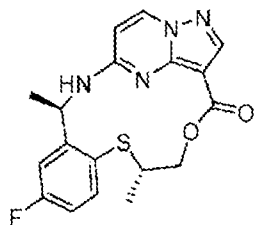
Procedimiento al que se hace referencia en la etapa C del ejemplo 13.

10

CL-MS: $m/z = 391 [M+H]^+$.

15

Etapla H: (1³E,1⁴E,3R,6S)-4⁵-fluoro-3,6-dimetil-8-oxa-5-tia-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



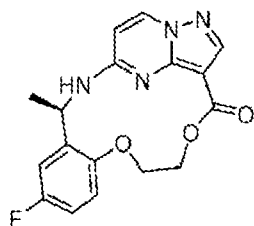
Procedimiento al que se hace referencia en la etapa D del ejemplo 13.

20 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,36-8,24 (m, 2H), 7,49-7,47 (m, 1H), 7,13-6,94 (m, 2H), 6,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,12-6,01 (m, 1H), 5,66 (s, 1H), 5,03 (dd, $J = 11,6, 3,8$ Hz, 1H), 3,87 (t, $J = 11,2$ Hz, 1H), 3,50-3,49 (m, 1H), 1,74 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,50 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H).

CL-MS: $m/z = 373 [M+H]^+$.

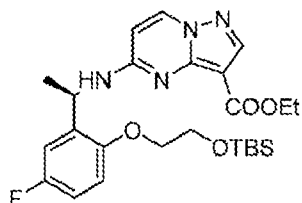
25

Ejemplo 13: (R,1³E,1⁴E)-4⁵-fluoro-3-metil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



30

Etapla A: (R)-5-((1-(2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-5-fluorofenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo



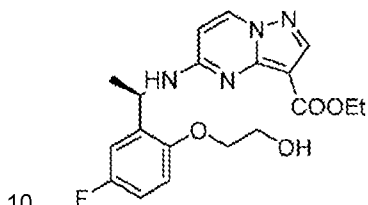
35

A una solución de (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo (600 mg, 1,74 mmol, 1,0 eq), pivalato de (R)-2-hidroxipropilo (614 mg, 2,48 mmol, 2,0eq), PPh₃ (911 mg, 3,48 mmol, 2,0 eq) en 35 mL de CH₂Cl₂, se añadió lentamente DIAD (703 mg, 3,48 mmol, 2,0 eq) en un baño de hielo. Después de calentar a temperatura, la mezcla de reacción se agitó durante la noche. El análisis mediante

TLC mostró que la reacción se completó y el contenido se evaporó al vacío para obtener el residuo, que se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para producir el producto puro (719 g, rendimiento del 82%).

5 CL-MS: $m/z = 503 [M+H]^+$

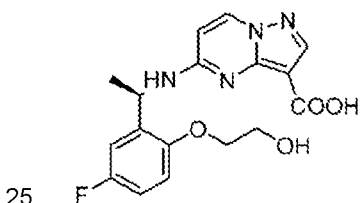
Etapla B: (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo



A una solución de (R)-5-((1-(2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-5-fluorofenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo (719 mg, 1,43 mmol, 1,0 eq) en THF, se añadió fluoruro de tetrabutilamonio trihidrato (900 mg, 2,86 mmol, 2,0 eq) en un baño de hielo. Después de añadir y calentar a temperatura ambiente, la reacción se agitó durante 1,5 horas más a temperatura ambiente. Después de añadir agua, el producto se extrajo 3 veces con EA. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con agua, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a mediante destilación a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (519 mg, rendimiento del 93 %).

20 CL-MS: $m/z = 389 [M+H]^+$.

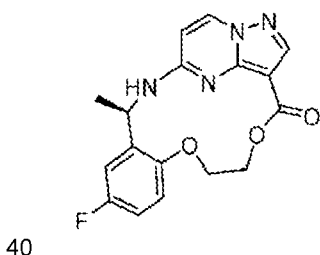
Etapla C: (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo



A una solución de (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo (519 mg, 1,34 mmol, 1,0 eq) en MeOH/ H_2O (5:1) se añadió NaOH (1,6 g, 40,2 mmol, 40,0 eq) y se calentó a 80 °C durante 5,0 horas bajo un baño de aceite. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se concentró parcialmente mediante destilación al vacío y se acidificó con una solución de HCl 1N hasta pH 5. La suspensión resultante se extrajo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporaron al vacío para obtener el producto. (482 mg, rendimiento del 100%).

35 CL-MS: $m/z = 361 [M+H]^+$.

Etapla D: (R,1³E,1⁴E)-4⁵-fluoro-3-metil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenacilononafan-9-ona

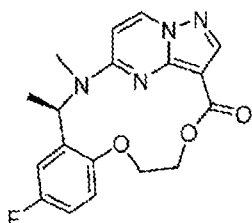


A una solución de ácido (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxílico (150 mg, 0,42 mmol, 1,0 eq) y clorhidrato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (161 mg, 0,84 mmol, 2,0 eq) en DCM se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (5 mg, 0,1 eq). La mezcla se calentó mediante un baño de aceite hasta que estuvo a temperatura ambiente durante 5,0 horas. Después de enfriar a TA, se añadió agua. La suspensión resultante se extrajo 3 veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron una vez con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida. El

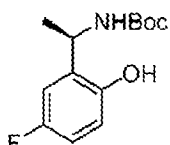
residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (60mg, rendimiento del 42 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,26 (s, 1H), 8,20 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,04 (dd, *J* = 9,0, 2,6 Hz, 1H), 6,95-6,78 (m, 2H), 6,21 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,14-6,01 (m, 1H), 5,85 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 5,06 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 4,62-4,59 (m, 1H), 4,49-4,45 (m, 1H), 4,39-4,19 (m, 2H), 1,56 (d, *J* = 7,0 (Hz, 3H). CL-MS: *m/z* = 343 [M+H]⁺.

Ejemplo 23: (*R*,1³*E*,1⁴*E*)-4⁵-fluoro-2,3-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5 - a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



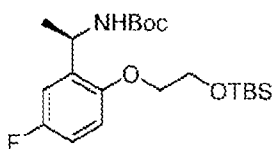
EtapA: (*R*)-(1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)carbamato de terc-butilo



A una solución de clorhidrato de (*R*)-2-(1-aminoetil)-4-fluorofenol (3,7 g, 19,3 mmol, 1,0 eq) y trimetilamina (TEA) (5,4 mL, 38,6 mmol, 2,0 eq) en DCM se añadió dicarbonato (Boc₂O) de di-terc-butilo (4,6 g, 21,2 mmol, 1,1 eq). Después de añadirlo, la mezcla se agitó a ta durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto (4,9 g, rendimiento del 100 %).

CL-MS: *m/z* = 256 [M+H]⁺.

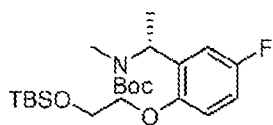
EtapB: (*R*)-(1-(2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-5-fluorofenil)etil)carbamato de terc-butilo



A una solución de (*R*)-(1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)carbamato de terc-butilo (600 mg, 2,35 mmol, 1,0 eq) y K₂CO₃ (1,3 g, 9,4 mmol, 4,0 eq) en DMF se añadió (2-bromoetoxi)(terc-butil)dimetilsilano (1,1 g, 4,7 mmol, 2,0 eq) y se calentó a 80 °C en un baño de aceite durante 4,0 horas. La mezcla se enfrió a ta. Después de añadir agua, la mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron 3 veces con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (670 mg, rendimiento del 69 %).

CL-MS: *m/z* = 414 [M+H]⁺.

EtapC: (*R*)-(1-(2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-5-fluorofenil)etil)(metil)carbamato de terc-butilo

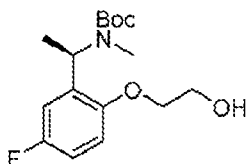


A una solución de (*R*)-(1-(2-(2-((tert-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-5-fluorofenil)etil)carbamato de terc-butilo (670 mg, 1,62 mmol, 1,0 eq) en DMF se añadió NaH (194 mg, 4,86 mmol, 3,0 eq) en un baño de hielo. Después de añadir, la mezcla se agitó a la temperatura durante 15 minutos y se añadió CH₃I (460 mg, 3,24 mmol, 2,0 eq). La reacción se continuó durante 2 horas más. Después de añadir agua, la mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron 3 veces con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en

columna sobre sílice para obtener el producto (692 mg, rendimiento del 100 %).

CL-MS: $m/z = 428 [M+H]^+$.

5 **Etapla D: (R)-(1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)(metil)carbamato de terc-butilo**

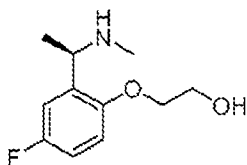


Procedimiento al que se hace referencia en la etapa B del ejemplo 13.

10

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,12-6,94 (m, 2H), 6,84-6,80 (mHz, 1H), 5,92 (bRs, 1H), 4,63 (bRs, 1H), 4,15-4,13 (m, 1H), 3,92-3,88 (m, 3H), 2,55 (s, 3H), 1,53 (s, 9H), 1,46 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H). CL-MS: $m/z = 314 [M+H]^+$.

15 **Etapla E: (R)-2-(4-fluoro-2-(1-(metilamino)etil)fenoxi)etan-1-ol**



Procedimiento al que se hace referencia en la etapa C del ejemplo 24.

20

CL-MS: $m/z = 214 [M+H]^+$.

Etapla F: (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)(metil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato de etilo

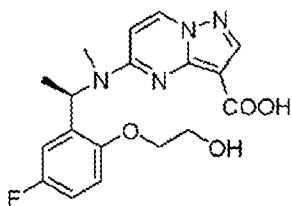
25

Procedimiento al que se hace referencia en la etapa D del ejemplo 1.

CL-MS: $m/z = 403 [M+H]^+$.

30

Etapla G: Ácido (R)-5-((1-(5-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilílico



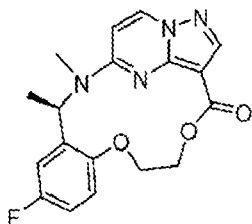
Procedimiento al que se hace referencia en la etapa C del ejemplo 13.

35

CL-MS: $m/z = 375 [M+H]^+$.

Etapla H: (R,1³E,1⁴E)-4⁵-fluoro-2,3-dimetil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a] pirimidina-4(1,2)-benzenacliclononafan-9-ona

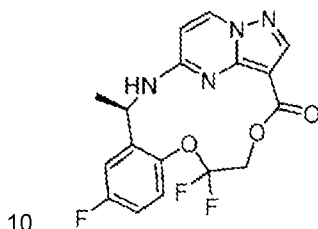
40



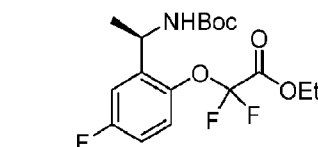
Procedimiento al que se hace referencia en la etapa D del ejemplo 13.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39-8,25 (m, 2H), 7,01-6,69 (m, 4H), 6,42 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 5,0-5,07 (m, 1H), 4,58-5,56 (m, 1H), 4,44-4,42 (m, 1H), 4,17-4,15 (m, 1H), 3,43 (s, 3H), 1,62 (d, *J* = 7,4 Hz, 3H). CL-MS: *m/z* = 357 [M+H]⁺.

Ejemplo 24: (*R*,1³*E*,1⁴*E*)-4⁵,6,6-trifluoro-3-metil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



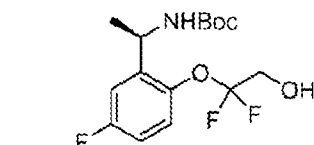
EtapA: (*R*)-2-(2-(1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)-4-fluorofenoxi)-2,2-difluoroacetato de etilo



A una solución de (*R*)-(1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etil)carbamato de *tert*-butilo (700 mg, 2,75 mmol, 1,0 eq) y 2-bromo-2,2-difluoroacetato de etilo (1,4g, 6,86 mmol, 2,5 eq) en DMF se añadió DBU (1,06 g, 6,86 mmol, 2,5 eq) y se calentó a 70 °C bajo un baño de aceite durante 4,0 horas. La mezcla se enfrió a ta. Después de añadir agua, la mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron 3 veces con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (720 mg, rendimiento del 69 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33-7,23 (m, 1H), 7,10-7,07 (m, 1H), 6,97-5,93 (m, 1H), 5,19 (s, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,45 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,49-1,39 (m, 15H).

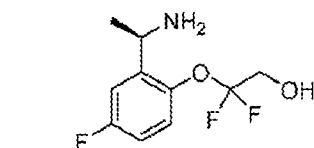
EtapA: (*R*)-(1-(2-(1,1-difluoro-2-hidroxietoxi)-5-fluorofenil)etil)carbamato de *tert*-butilo



A una solución de (*R*)-2-(2-(1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)-4-fluorofenoxi)-2,2-difluoroacetato de etilo (720 mg, 1,9 mmol, 1,0 eq) en THF se añadió hidruro de litio y aluminio (160 mg, 4,2 mmol, 2,2 eq) en un baño de hielo. La mezcla se agitó a 0°C durante 2 horas. La reacción se extinguió añadiendo agua. La mezcla se extrajo 3 veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron 3 veces con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice para obtener el producto puro (450 mg, rendimiento del 71 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36-7,33 (m, 1H), 7,14-6,94 (m, 2H), 5,27 (s, 1H), 4,87 (bRs, 2H), 4,05-3,97 (m, 2H), 1,51-1,41 (m, 12H).

EtapA: (*R*)-2-(2-(1-aminoetil)-4-fluorofenoxi)-2,2-difluoroetan-1-ol



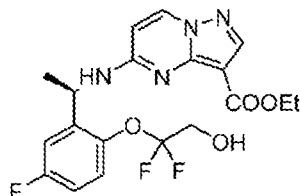
A una solución de (*R*)-(1-(2-(1,1-difluoro-2-hidroxietoxi)-5-fluorofenil)etil)carbamato de *tert*-butilo (450 mg, 1,34 mmol, 1,0 eq) en DCM se le añadieron 4 mL de ácido trifluoroacético (TFA). La mezcla se agitó durante 3 horas. Se añadió solución saturada de bicarbonato de sodio hasta que estuvo alcalina. La mezcla se extrajo 3 veces

con acetato de etilo. Los extractos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el producto puro (315 mg, rendimiento del 100 %).

CL-MS: m/z = 236 [M+H]⁺.

5

Etapla D: (R)-5-((1-(2-(1,1-difluoro-2-hidroxietoxi)-5-fluorofenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de etilo



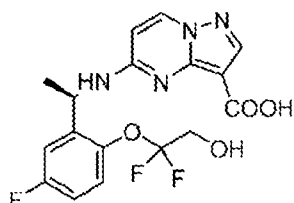
10

Procedimiento al que se hace referencia en la etapa D del ejemplo 1.

CL-MS: m/z = 425 [M+H]⁺.

15

Etapla E: (R)-5-((1-(2-(1,1-difluoro-2-hidroxietoxi)-5-fluorofenil)etil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de etilo



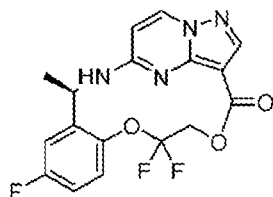
20

Procedimiento al que se hace referencia en la etapa C del ejemplo 13.

CL-MS: m/z = 397 [M+H]⁺.

25

Etapla F: (R,1³E,1⁴E)-4⁵,6,6-trifluoro-3-metil-5,8-dioxa-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



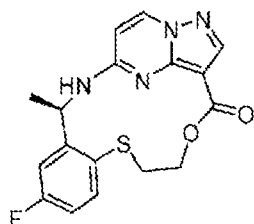
30

Procedimiento al que se hace referencia en la etapa D del ejemplo 13.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,27-8,25 (m, 2H), 7,23 (s, 1H), 7,08 (dd, J = 8,8, 3,0 Hz, 1H), 6,94-6,90 (m, 1H), 6,26 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 5,85 (bRs, 1H), 5,57 (bRs, 1H), 5,01-4,93 (m, 1H), 4,82-4,77 (m, 1H), 1,58 (d, J = 7,0 Hz, 3H). CL-MS: m/z = 379 [M+H]⁺.

35

Ejemplo 25: (R,1³E,1⁴E)-4⁵-fluoro-3-metil-8-oxa-5-tia-2-aza-1(5,3)-pirazolo[1,5-a]pirimidina-4(1,2)-benzenaciclonoanfan-9-ona



40

El compuesto se sintetizó según el ejemplo 9.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,33-8,20 (m, 2H), 7,44-7,42 (m, 1H), 7,06-7,04 (m, 1H), 6,96-6,94 (m, 1H), 6,25 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,17-5,98 (m, 1H), 5,64 (s, 1H), 5,02-5,00 (m, 1H), 4,21-4,06 (m, 1H), 3,78-3,76 (m, 1H), 3,33-3,18 (m, 1H), 1,49 (d, J = 7,0 Hz, 3H). CL-MS: m/z = 359 [M+H]⁺.

5

Evaluación de compuestos

1. Actividad inhibidora de compuestos sobre TRKA, TRKB, TRKC y ROS1 (CI₅₀)

- 10 La actividad inhibidora de los compuestos sobre las quinasas TRKA, TRKB, TRKC y ROS1 se analizó con el ensayo de cambio de movilidad. La plataforma de detección es tecnología de chip microfluídico basada en MSA, que aplica el concepto básico de electroforesis capilar al entorno microfluídico. El sustrato utilizado en el experimento es un polipéptido marcado con fluorescencia. Bajo la catálisis de la enzima en el sistema de reacción, el sustrato se transforma en un producto, con la carga modificada en consecuencia. La tecnología
- 15 MSA podría detectar el sustrato y el producto con diferente carga por separado.

La operación se describe de la siguiente manera:

- 20 El polvo compuesto se disolvió en DMSO al 100% (Sigma, Cat. D8418-1I) para preparar una solución de almacenamiento de 10 mM. Los compuestos tenían una concentración de prueba inicial de 100 nM y se diluyeron en serie tres veces para obtener 10 muestras para inspección de múltiples orificios. Para los objetivos de las quinasas TRKA, TRKB y TRKC, se utilizó Loxo-101 (Selleckchem, Cat. S7960) como compuesto de referencia positivo; para ROS1, se utilizó estaurosporina (Selleckchem, Cat. S1421) como compuesto de referencia positivo. Los compuestos diluidos en gradiente se mezclaron con la quinasa
- 25 TRKA/TRKB/TRKC/ROS1 (Carna, Cat. 08-186/08-187/08-197/08-163) con una concentración final de 2,5 nM/2,55 nM/2,5 nM/0,3 nM en una placa Optiplate-384F (PerkinElmer, Cat. 6007270) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de eso, se añadió ATP con una concentración final de 47,8 μM/71,2 μM/44,4 μM/26,7 μM, y se añadió 3 μM de sustrato quinasa 22 (GL Biochem, Cat. 112393). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 min/40 min/20 min/20 min respectivamente. Una vez
- 30 finalizada la reacción, se leyó la velocidad de conversión mediante Caliper EZ Reader II.

Análisis de datos:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Conversión}\%_{\text{Máx}} - \text{Conversión}\%_{\text{muestra}}}{\text{Conversión}\%_{\text{Máx}} - \text{Conversión}\%_{\text{min}}} \times 100$$

35

Conversión%_ Muestra: velocidad de conversión de la muestra;

Conversión%_ Min: valor medio del control negativo, que representa la velocidad de conversión sin actividad enzimática;

40

Conversión%_ Máx: valor medio del control positivo, que representa la lectura de la velocidad de conversión sin inhibición del compuesto.

- 45 Tomando el valor logarítmico de la concentración como eje X y la tasa de inhibición porcentual como eje Y, la curva de respuesta a la dosis se ajustó mediante el software de análisis GraphPad Prism 5, de este modo se obtuvo el valor CI₅₀ de cada compuesto sobre la inhibición de la actividad enzimática.

2. Actividad inhibidora de compuestos de ROS 1-G2032R (CI₅₀)

- 50 Basándose en el principio de LanceUltra (Perkin Elmer, CR97-100), se estableció la plataforma de detección de la actividad de la quinasa ROS1-G2032R para determinar la actividad inhibidora de los compuestos.

- El polvo compuesto se disolvió en DMSO al 100 % (Sigma, Cat. D8418-1I) para preparar una solución de almacenamiento de 10 mM. Los compuestos tenían una concentración de prueba inicial de 1000 nM y se diluyeron en serie tres veces para obtener 11 muestras para inspección de múltiples orificios. Se utilizó TPX-0005 (suministrado por WuXi AppTec) como compuesto de referencia positivo. Los compuestos diluidos en gradiente se mezclaron con quinasa ROS1-G2032R 0,016 nM (Abcam, Cat. ab206012), péptido LANCE Ultra ULight-poly GT 50 nM (PerkinElmer, Cat. TRF0100-M) y 2,6 μM de ATP (Sigma, Cat. A7699) en la placa Optiplate-384F (PerkinElmer, Cat. 6007299) y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se
- 55 utilizaron 5 μl de EDTA 40 mM para detener la reacción. Después se añadió europio-anti-fosfotirosina (PT66) 2 nM (PerkinElmer, Cat. AD0069) y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. La señal LANCE se obtuvo mediante En Visiontm (PerkinElmer, 2014) (luz de excitación, 320 nm; luz de emisión, 665 nm). Los valores de CI₅₀ de los compuestos se calcularon utilizando el software XLFIT5 (IDBS).

- 60 3. Actividad inhibidora de compuestos sobre TRKA y ALK-L1196M (IC₅₀)

- Basándose en el principio HTRF de Cisbio (Cisbio, Cat.08-52), se estableció la plataforma de detección de actividad de quinasas TRKA y ALK-L1196M para determinar la actividad inhibidora de los compuestos. El polvo compuesto se disolvió en DMSO al 100 % (Sigma, Cat. D8418-1l) para preparar una solución de almacenamiento de 10 mM. Los compuestos tenían una concentración de prueba inicial de 1000 nM y 10 000 nM respectivamente, se diluyeron en serie tres veces para obtener 11 muestras para inspección de múltiples orificios. RXDX-101 (WuXi AppTec. suministrado) o Crizotinib (WuXi AppTec. Supplied) se utilizó como compuesto de referencia positivo.
- Los compuestos diluidos en gradiente se mezclaron con 0,5 nM TRKA (Carna, Cat. 08-186)/ALK-L1196M (Carna, Cat. 08-529), 0,3 µM/1 µM TK Susstrate-biotin y 90 µM/30 µM ATP (Sigma, Cat. A7699) en una placa Optiplate-384F (PerkinElmer, Cat. 6007299) y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min/120 min. Después se añadieron 0,67 nM de Eu-TK-Antibody y 50 nM de Streptavidin-XL-665, se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. El valor de fluorescencia se obtuvo mediante Envision (PerkinElmer, #2014) (luz de excitación, 320 nm; luz de emisión, 665 nm). Los valores de Cl_{50} de los compuestos se calcularon utilizando el software XLFIT5 (IDBS).

4. Efecto inhibidor de compuestos sobre la proliferación de líneas celulares estables de fusión TRK y mutantes (Cl_{50})

- Se probaron los efectos inhibidores de los compuestos en seis líneas celulares, mientras que LOXO-101 (Selleckchem, Cat. S7960) y TPX-0005 (Selleckchem, Cat. S8583) se utilizaron como compuesto de control. En este experimento se utilizaron seis líneas celulares: Ba/F3 LMNA-NTRK1-WT, Ba/F3 LMNA-NTRK1-G595R, Ba/F3 ETV6-NTRK2-WT, Ba/F3 ETV6-NTRK2-G639R, Ba/F3 ETV6-NTRK2-G639R y Ba/F3 ETV6-NTRK3-G623R. Para las seis líneas celulares, la concentración máxima de prueba del compuesto fue 1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 µM y 10 µM, se diluyeron en gradiente de 3,16 veces para obtener 9 muestras.

La operación se describe brevemente de la siguiente manera:

- Las células en fase de crecimiento logarítmico se recolectaron para asegurar que la viabilidad celular fuera superior al 90 %. Se sembraron 3000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Corning, Cat# 3603). Las células se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de humedad. Después, a cada pocillo que contenía las células de la placa de 96 pocillos se le añadieron las soluciones compuestas, 3 pocillos para cada solución compuesta, y se continuó incubando durante otras 72 horas. Después se utilizó el kit CellTiter-Glo® (Promega, Cat#G7572) para realizar la detección. Primero, se fundió el reactivo CTG y la placa celular se equilibró a temperatura ambiente. Se añadió el mismo volumen de solución CTG a cada pocillo y se hizo vibrar en el agitador durante 5 minutos para lisar las células. La placa celular se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos para estabilizar la señal luminiscente. El valor luminiscente se recopiló mediante el detector de microplacas SpectraMax (MD, 2104-0010A). La curva dosis-respuesta fue ajustada mediante el software de análisis GraphPad Prism 5, con lo que se obtuvo el valor Cl_{50} de cada compuesto sobre la inhibición de la proliferación celular.

$$\text{Tasa de supervivencia celular (\%)} = (\text{lum}_{\text{fármaco}} - \text{lum}_{\text{medio}}) / (\text{lum}_{\text{célula}} - \text{lum}_{\text{medio}}) \times 100 \%$$

Tabla 1. Actividad inhibidora de las quinasas TRKA y ALK-L1196M

Compuesto	TRKA	ALK L1196M
	Cl_{50} (nM)	Cl_{50} (nM)
Crizotinib	ND	106
Ceritinib	182	ND
Alectinib	60,4	ND
Lorlatinib	6,2	9
TPX-0005	0,067	39
Ejemplo 1	0,13	50

Tabla 2. Actividad inhibitoria sobre las quinasas TRKA, TRKB, TRKC, ROS1 y ROS1-G2032R

Compuesto	TRKA	TRKB	TRKC	ROS1	ROS1-G2032R
	Cl_{50} (nM)	Cl_{50} (nM)	Cl_{50} (nM)	Cl_{50} (nM)	Cl_{50} (nM)

LOXO-101	1,1	1,9	2,0	-	-
TPX-0005	0,32	0,44	0,55	0,17	1,01
Ejemplo 1	0,42	0,50	0,61	0,33	0,36
Ejemplo 13	0,62	0,90	0,73	1,9	-
Ejemplo 6	0,75	1,20	1,20	0,78	-
Ejemplo 23	0,39	0,48	0,63	4,8	-
Ejemplo 24	0,56	0,60	0,75	0,29	-
Ejemplo 9	0,59	0,86	0,76	0,54	-
Ejemplo 25	1,10	1,60	1,10	1,20	-

Tabla 3. Actividad inhibidora sobre la proliferación de líneas celulares estables de fusión TRK y mutantes

Línea celular	Cl ₅₀ (nM)		TRKC
	LOXO-101	TPX-0005	Ejemplo 1
Ba/F3 LMNA-NTRK1-WT	47,4*	0,7 [#]	5,4*/1,0 [#]
Ba/F3 LMNA-NTRK1-G595R	2174,3*	2,0 [#]	7,8*/1,3 [#]
Ba/F3 ETV6-NTRK2-WT	75,3*	2,5 [#]	7,8*/4,2 [#]
Ba/F3 ETV6-NTRK2-G639R	8183,5*	86,6 [#]	100,5*/64,6 [#]
Ba/F3 ETV6-NTRK3-WT	6,8*	0,8 [#]	0,2*/1,0 [#]
Ba/F3 LMNA-NTRK3-G623R	1095,7*	9,0 [#]	8,4*/8,3 [#]
Nota: *el mismo lote de prueba; [#] el mismo lote de prueba.			

5

5. Análisis del efecto sinérgico

Las células H1975 (doble mutación L858R y T790M) se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10 % de FBS y 1 % de P/S (promicina/estreptomicina). Para probar los compuestos, se sembraron células H1975 en una placa de 96 pocillos (Corning, Cat#3917) a 3000 células/pocillo y los compuestos se añadieron a 195 µL de solución/pocillo. La concentración de prueba inicial del compuesto fue 10 µM, diluida en gradiente 3 veces para obtener 11 muestras. Se añadieron 4 µL de cada muestra a 96 µL de medio RPMI-1640 para diluir el compuesto 25x. Se añadieron 5 µL a 195 µL de medio celular (la concentración final de DMSO es 0,1 %, v/v). Después de 72 h de incubación, se añadieron 35 µL de CellTiter-Blue® (Promega, Cat#G8082) a las células. La señal de fluorescencia se midió con FlexStation 3 (Molecular Devices) según las instrucciones y el valor Cl₅₀ del compuesto sobre la inhibición de la proliferación celular se calculó mediante el software Graphpad Prism 5.0. Se utilizó el método del índice de Chou-Talalay para analizar el efecto de la combinación. $0,9 \leq \text{Índice de combinación (IC)} \leq 1,1$ significa efecto aditivo, $0,8 \leq \text{IC} < 0,9$ significa efecto sinérgico bajo, $0,6 \leq \text{IC} < 0,8$ significa efecto sinérgico medio, $0,4 \leq \text{IC} < 0,6$ significa efecto sinérgico alto, $0,2 \leq \text{IC} < 0,4$ significa efecto sinérgico fuerte.

Los datos mostraron que la combinación del ejemplo 1 y AZD9291 mostró un efecto sinérgico medio a alto sobre las células mutantes dobles de EGFR H1975 (mutación doble L858R y T790M) (Ejemplo 1, IC = 0,53-0,67), lo que indica que la combinación del compuesto de prueba y el inhibidor de EGFR puede superar la resistencia de EGFR.

6. Análisis farmacocinético

Las ratas SD macho se agruparon, y cada grupo tenía 3 ratas. A cada grupo se le administró el compuesto del Ejemplo 1 (5 mg/kg) o TPX-0005 (5 mg/kg) mediante una única sonda oral, o el compuesto del Ejemplo 1 (1 mg/kg) mediante inyección intravenosa. Los animales ayunaron durante la noche desde 10 horas antes de la administración hasta 4 horas después de la administración. Se recogieron muestras de sangre a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la administración en el grupo oral y a las 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la inyección en el grupo intravenoso. Después de la anestesia con isoflurano, se colocaron 0,3 mL de sangre entera extraída a través del plexo venoso del fondo en el tubo de anticoagulante con heparina. La muestra se centrifugó a 4°C a 4000 rpm durante 5 min. El plasma se transfirió al tubo de centrifuga y se almacenó a -80°C hasta su análisis. El extracto del plasma extraído por precipitación de proteínas se analizó mediante CL/MS/MS. Los resultados de PK se muestran en la Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 4. Análisis farmacocinético en ratas (PO, 5 mg/kg)

	Ejemplo 1	TPX-0005
T _{1/2} (h)	1,84	3,55
T _{máx} (h)	0,667	1,33
C _{máx} (ng/mL)	952	503
AUC _{0-inf} (h*ng/mL)	3548	2948
F(%)	114	91,5

5 Tabla 5. Análisis PK en ratas (IV, 1 mg/kg)

	Ejemplo 1
T _{1/2} (h)	1,70
C ₀ (ng/mL)	217
V _{dss} (L/kg)	4,26
C ₁ (mL/min/kg)	27,2
AUC _{0-inf} (h*ng/mL)	621

Los datos mostraron que el compuesto del Ejemplo 1 tuvo un mejor desempeño farmacocinético oral que el de TPX-0005, y la biodisponibilidad oral del Ejemplo 1 alcanzó el 100 %. Según el mismo método, todos los demás compuestos probados también mostraron un mejor perfil de propiedades PK que el TPX-0005.

7. Distribución de sangre al cerebro

Las ratas SD macho se agruparon, y cada grupo tenía 12 ratas. A cada grupo se le administró el compuesto de los Ejemplos (10 mg/kg) mediante una única sonda oral. Los animales ayunaron durante la noche desde 10 horas antes de la administración hasta 4 horas después de la administración. Las ratas fueron sacrificadas a las 0,5, 1, 4 y 12 horas después de la administración y se recogieron sangre y tejidos cerebrales. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm a 4 °C durante 5 minutos y el plasma se transfirió al tubo de centrifuga y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. El extracto del plasma extraído por precipitación de proteínas se analizó mediante CL/MS/MS.

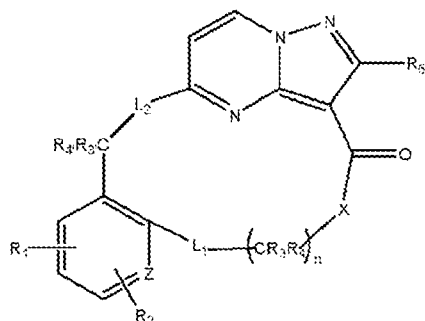
Tabla 6. Distribución de sangre al cerebro

Parámetro de PK	TPX-0005		Ejemplo 1	
	Plasma	Cerebro	Plasma	Cerebro
AUC _{0-inf} (nMh)	13947	2351	18163	20766
Relación (Cerebro/Plasma)	0,17		1,14	

Las referencias a métodos de tratamiento en la presente descripción se tienen que interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usar en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (1) o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo,



Fórmula (1)

en donde,

X se selecciona de -O- o -S-;

L1 se selecciona entre -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)2-, -NR6- o un enlace sencillo;

L2 se selecciona entre -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)2- o -NR6-;

R1, R2 y R5 se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1~8, un alcoxi C1~8, un haloalquilo C1~8, un cicloalquilo C3~8, un grupo heterocíclico C3~8, un grupo arilo C6~20, un grupo heteroarilo C5~20, hidroxilo, mercapto, carboxilo, grupo éster, acilo, amino, amida, sulfonilo o ciano;

los sustituyentes R3 y R4 en cada átomo de C se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1~8, un alcoxi C1~8, un haloalquilo C1~8, un cicloalquilo C3~8, un heterociclilo C3~8, un arilo C6~20, un heteroarilo C5~20, hidroxilo, mercapto, carboxi, grupo éster, acilo, amino, amido, sulfonilo, ciano, o los sustituyentes R3 y R4 junto con el grupo X forman un grupo cicloalquilo de 3-10 miembros, un grupo heterocíclico de 3-10 miembros que contiene al menos un heteroátomo, o un grupo heteroarilo de 5-10 miembros que contiene al menos un heteroátomo; o R3 y R4 son cada uno independientemente un enlace sencillo que conecta el átomo de C y el átomo de anillo macrocíclico adyacente;

R3 and R4 se seleccionan cada uno independientemente seleccionados de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1~8, un alcoxi C1~8, un haloalquilo C1~8, un cicloalquilo C3~8, un heterociclilo C3~8, un arilo C6~20, un heteroarilo C5~20, hidroxilo, mercapto, carboxi, éster, acilo, amino, amido, sulfonilo o ciano;

R6 se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C1~8, un alcoxi C1~8, un haloalquilo C1~8, un cicloalquilo C3~8, un heterociclilo C3~8, un arilo C6~20, un heteroarilo C5~20, hidroxilo, mercapto, carboxi, éster, acilo, amino, amido, sulfonilo o ciano;

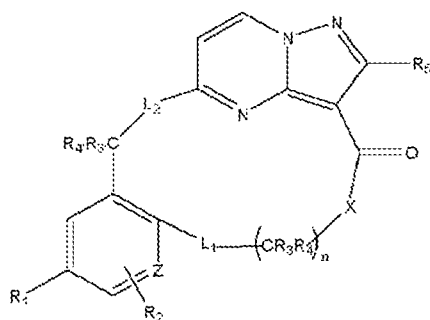
Z representa C o heteroátomo como un átomo de anillo;

n representa un número entero de 1 a 10;

los sustituyentes de los grupos mencionados anteriormente pueden seleccionarse de halógeno, un alquilo C1~8, un haloalquilo C1~8, un alcoxi C1~8, un cicloalquilo C3~8, un heterociclilo C3~8, un arilo C6~20, un heteroarilo C5~20, hidroxilo, mercapto, carboxi, éster, acilo, amino, amido, sulfonilo o ciano;

los heteroátomos mencionados anteriormente se seleccionan de N, O o S.

2. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la estructura de la fórmula (2),



Fórmula (2)

5 en donde R_1 es flúor o bromo; y/o

R_2 es hidrógeno, flúor o bromo.

10 3. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según la reivindicación 1 o 2, en donde la Fórmula (1) o la Fórmula (2), L_1 se selecciona de forma -O-, -S- o un enlace sencillo; y/o L_2 es -NR₆-.

15 4. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde en la Fórmula (1) o la Fórmula (2), n representa un número entero de 2, 3, 4, 5 o 6.

20 5. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde en la Fórmula (1) o la Fórmula (2), los sustituyentes R_3 y R_4 en cada átomo de C se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆, o R_3 y R_4 son cada uno independientemente un enlace sencillo que conecta el átomo de C y los átomos del anillo macrocíclico adyacentes; y/o

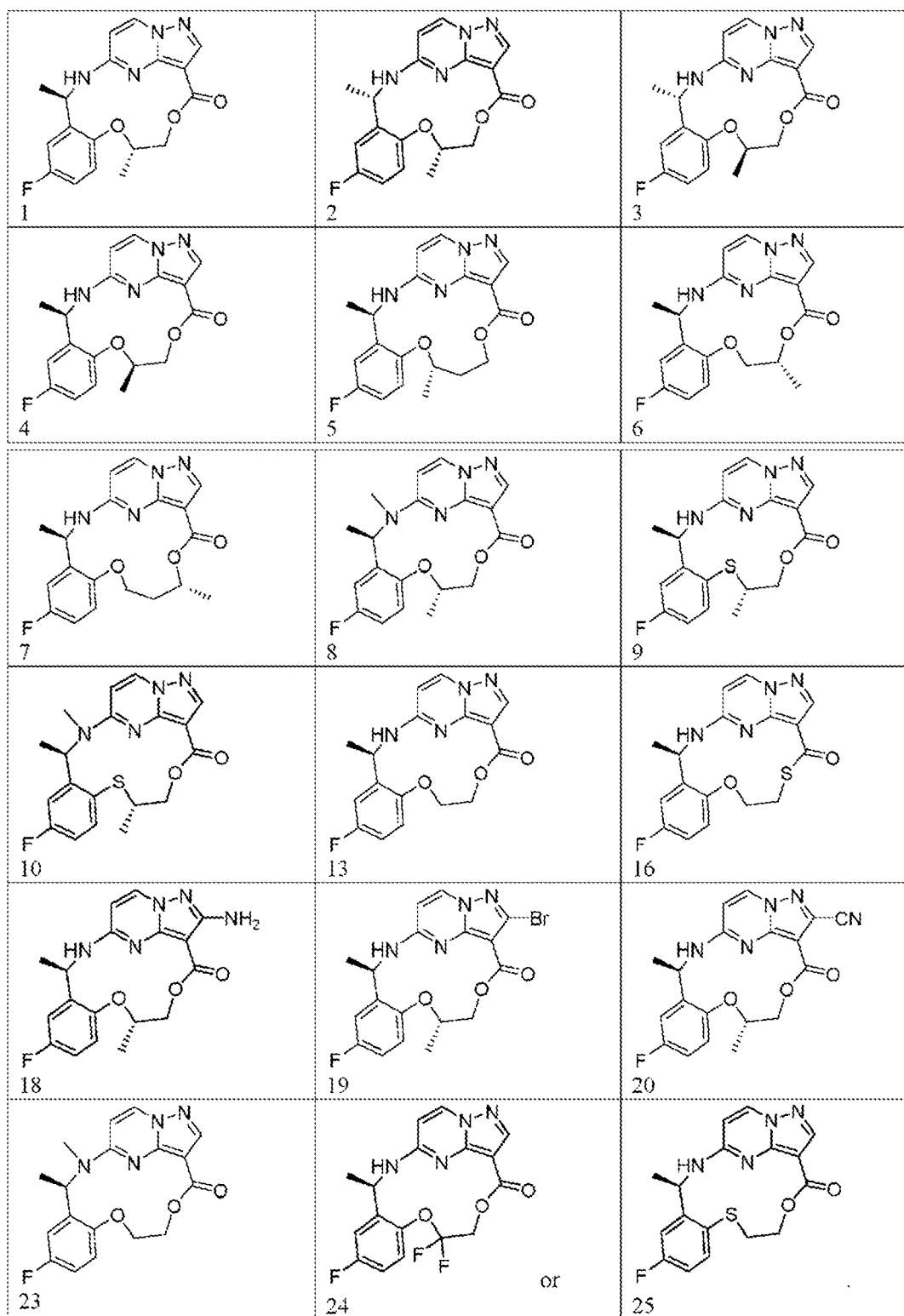
25 R_3 y R_4 se seleccionan cada uno independientemente de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅ o un cicloalquilo C₃₋₆; y/o

R_5 se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆, hidroxilo, mercapto, carboxilo, amino o ciano; y/o

30 R_6 se selecciona de los siguientes grupos sustituidos o no sustituidos: hidrógeno, halógeno, un alquilo C₁₋₅, un alcoxi C₁₋₅, un haloalquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆; y/o

35 los sustituyentes anteriores pueden seleccionarse entre flúor, bromo, -CN, -OH, -CF₃, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₄), -N(alquilo C₁₋₄)₂, -CO₂(alquilo C₁₋₄), -CO₂H, -NHC(O)alquilo C₁₋₄, -SO₂(alquilo C₁₋₄), -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁₋₄), -C(O)N(alquilo C₁₋₄)₂, un alquilo C₁₋₅, un cicloalquilo C₃₋₆, un heterociclilo C₃₋₆, un arilo C₆₋₁₀ o un heteroarilo C₅₋₁₀.

40 6. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el compuesto se selecciona de las siguientes estructuras:



5 7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 8. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, un polimorfo o un marcador isotópico del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por la tirosina quinasa.

9. El compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde la tirosina quinasa se selecciona de una o más

de las siguientes: ALK, ROS1, TRKA, TRKB, TRKC, JAK2, SRC, FYN, LYN, YES, FGR, FAK, AXL, ARKS.

- 5 10. El compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde las enfermedades mediadas por la tirosina quinasa incluyen cáncer, dolor, enfermedades neurológicas, enfermedades autoinmunes e inflamación.
11. La composición farmacéutica según la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por la tirosina quinasa.
- 10 12. Compuesto para uso según la reivindicación 11, en donde la tirosina quinasa se selecciona de una o más de las siguientes: ALK, ROS1, TRKA, TRKB, TRKC, JAK2, SRC, FYN, LYN, YES, FGR, FAK, AXL, ARKS.
13. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en donde las enfermedades mediadas por la tirosina quinasa incluyen cáncer, dolor, enfermedades neurológicas, enfermedades autoinmunes e inflamación.

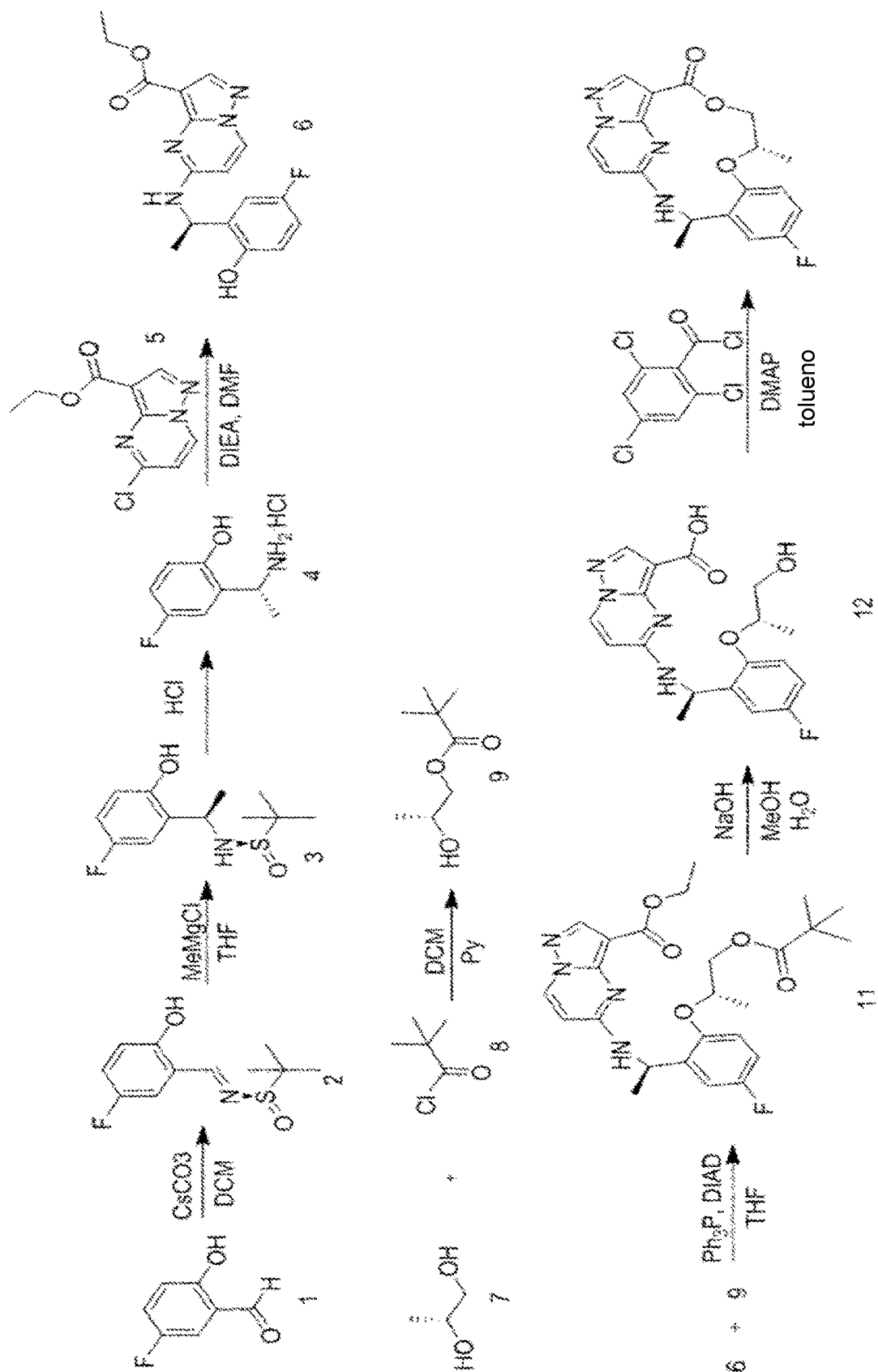


FIG. 1