INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA QUINASA, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO MÉDICO DE LOS MISMOS

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente de invención china No. CN201510856641.1, presentada el 30 de noviembre de 2015, la cual se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la medicina, y particularmente se refiere a una serie de 2- (piridin-2-il) amino pirimidinas sustituidas que tienen la actividad de inhibir la proteína quinasa, y a un método de preparación y uso farmacéutico de las mismas.

Antecedentes de la Técnica

El ciclo celular es una parte importante de la actividad vital de la célula. En el crecimiento celular normal, el logro de la progresión del ciclo celular depende de una regulación precisa y ajustada del ciclo celular por diversos niveles de factores reguladores. El núcleo de estos factores reguladores es la quinasa dependiente de ciclina (CDK - *Cyclin Dependent Kinase*) y sus reguladores positivos y negativos, es decir, la ciclina y los inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CDI - *Cyclin Dependent Kinase Inhibitors*). El complejo CDK-Ciclina formado por la ciclina y la proteína quinasa dependiente de ciclina está involucrado en el crecimiento, proliferación, latencia o apoptosis de las células. Durante el proceso del ciclo celular, la ciclina se expresa y degrada de manera periódica y continua, y se une a las CDK que se activan transitoriamente por ellas, respectivamente. La fosforilación de diferentes sustratos es catalizada por la actividad de CDK para llevar a cabo la promoción y conversión de diferentes fases del ciclo celular.

Actualmente, se han encontrado 13 miembros de la familia CDK, y estos son CDK1 - CDK13, respectivamente, en los que CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6 están involucrados en la regulación de la proliferación celular, y CDK7, CDK8, CDK9, CDK11, CDK12 y CDK13 están involucrados en la regulación de la transcripción.

La ciclina se divide en A - L, y diferentes CDK que conectan diferentes subtipos de Ciclina.

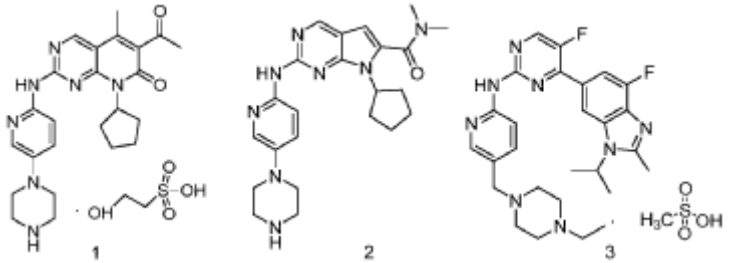
Entre ellos, la familia Ciclina D (Ciclina D1, D2, D3) comienza a expresarse en la fase G1, se une y activa CDK4 y CDK6 para formar un complejo CDK4 / 6 - Ciclina D, de manera que se fosforilan una serie de sustratos que incluyen Retino blastoma proteína (Rb). Después de la fosforilación, Rb libera las proteínas que están unidas a este y son inhibidas por este, incluyendo principalmente el factor de transcripción E2F el cual activa y transcribe algunos genes necesarios para entrar en la fase S (MA Ke, avance en el efecto antitumoral de los inhibidores CDK 4 / 6, *World Notes on Antibiotics*, 2013, 34 (5): 197-202). Si el equilibrio se rompe debido a diversos factores, ya sea que se aumente la señal para promover la proliferación celular o se disminuya la señal para inhibir la proliferación celular en cierta medida, la proliferación celular estará fuera de control, y entonces se produce el tumor. Se ha encontrado en el estudio que la anomalía de la vía ciclina D – CDK 4 /6 - INK4 - Rb está presente en aproximadamente el 80% de los cánceres humanos (1. Malumbres M, Barbacid M., *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer* (Hacer el ciclo o no hacer el ciclo: una decisión crítica en el cáncer) [J]. Nature Reviews Cancer, 2001, 1 (3): 222; 2. Shapiro GI., *Ciclina-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment* (vías de la quinasa dependiente de ciclina como objetivos para el tratamiento del cáncer) [J]. J Clinical Oncology, 2006, 24 (11) : 1770). El cambio de esta vía acelera el proceso de la fase G1, de modo que las células tumorales se aceleran en proliferación y obtienen una ventaja de supervivencia. Por lo tanto, la intervención en la vía se ha convertido en una estrategia terapéutica y, por lo tanto, la CDK 4/6 se ha convertido en uno de los potenciales objetivos antitumorales.

Las ventajas de CDK 4/6 como un objetivo antitumoral se encuentran en que: (1) la mayoría de las células proliferantes dependen de la proliferación de CDK2 o CDK4/6, pero los inhibidores de CDK4/6 no muestran citotoxicidad como "inhibidores pan-CDK", tales como mielosupresión y la reacción intestinal; y (2) los experimentos preclínicos muestran que si aumenta el nivel de ciclina D en las células o se inactiva el p16INK4a, la sensibilidad de las células al fármaco puede aumentar. Dado que las células tumorales exhiben el fenómeno mencionado anteriormente en relación con las células normales, la focalización de los fármacos se incrementa hasta cierto punto.

Además de la inhibición del crecimiento tumoral, los inhibidores de CDK también se usan en el tratamiento de otros trastornos, por ejemplo, trastornos cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, restenosis después del implante de un *stent* vascular y otros trastornos cardiovasculares causados por proliferación celular anormal; por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades causadas por hongos, parásitos protozoarios (como el Plasmodium falciparum) e infecciones por virus de ADN y ARN, incluyendo malaria, SIDA, y demás. Adicionalmente, se

ha encontrado además en los estudios que los inhibidores de CDK también pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunes (tales como psoriasis, artritis reumatoide, glomerulonefritis y lupus eritematoso, etc.) e inhibir la proliferación de células inflamatorias.

Dado que el documento WO9811095 divulga una serie de compuestos de 2-pirimidinamina que tienen actividad inhibidora de citoquinas, muchos compuestos basados en dicha estructura central y que tienen actividad inhibidora de CDK4/6 han aparecido sucesivamente en la técnica anterior, y algunos se han convertido en fármacos candidatos prometedores, e incluso han ingresado a ensayos clínicos fase III. Por ejemplo, el compuesto PD0332991, también conocido como Palbociclib, el cual ha sido divulgado en el documento WO2003062236, está representado por la fórmula estructural 1, y fue desarrollado por Pfizer. El compuesto PD0332991 tiene IC_{50}s de 11 nmol/L y 15 nmol/L para inhibir CDK4 y CDK6, respectivamente; y su IC_{50} para inhibir CDK2, CDK1 y CDK5 es mayor que 10 μmol/L (Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, y otros *Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts* (Inhibición específica de quinasa dependiente de ciclina 4/6 por medio de PD 0332991 y actividad antitumoral asociada en xenoinjertos de tumor humano [J]). Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3 (11): 1427). El compuesto LEE011 el cual está siendo desarrollado por Novartis (divulgado en el documento WO2011101409) está representado por la fórmula estructural 2. El compuesto LY2835219 (divulgado por el documento WO2010075074), también conocido como Bemaciclib, está representado por la fórmula estructural 3; se ha reportado que sus CI_{50}s para inhibir CDK4 y CDK6 son 2 nmol/L y 9,9 nmol/L, respectivamente (Lawrence MG, SFCai, X. Lin y otros. *Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine* (Caracterización preclínica del inhibidor de CDK4/6 LY2835219: actividades antitumorales independientes / dependientes del ciclo celular *in vivo* solas / en combinación con gemcitabina [J]). Invest New Drugs, (2014), 32: 825). Actualmente, LY2835219 está en su fase III de ensayo clínico por parte de Eli Lilly Company.



Debido a la aparición de estos compuestos, CDK4/6 se ha convertido en un claro objetivo antitumoral. El solicitante también ha presentado una solicitud de patente (No. 201510708487.3, presentada el 27 de octubre de 2015) para una serie de nuevas 2- (piridin-2-il) aminopirimidinas sustituidas las cuales exhiben la actividad de inhibir selectivamente CDK4/6.

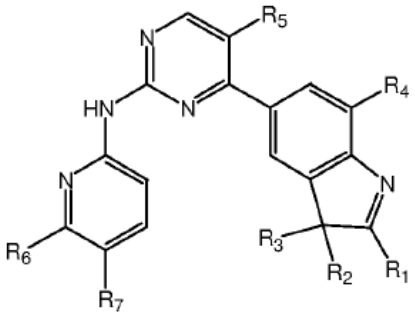
Los tumores malignos siguen siendo una amenaza grave para la salud humana. Por lo tanto, es necesario y urgente desarrollar inhibidores de CDK4 / 6 con mayor actividad, selectividad y biodisponibilidad a fin de proporcionar más opciones clínicas para el tratamiento de enfermedades asociadas con la proliferación celular anormal, como el cáncer.

Resumen de la invención

En vista de los problemas descritos anteriormente, un objeto de la presente invención es proporcionar un compuesto novedoso de 2-(piridin-2-il) aminopirimidina sustituido. El compuesto proporcionado en la invención puede inhibir selectivamente la ciclina quinasa CDK4/6 y detener la célula en la fase G1, y por lo tanto puede usarse para tratar el trastorno proliferativo celular.

Para lograr el efecto técnico descrito anteriormente, la presente invención proporciona las siguientes soluciones técnicas:

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula estructural I, o un tautómero, un mesómero, un racemato, un enantiómero, un diastereómero, un compuesto deuterado, un profármaco o una mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula estructural I o su tautómero, mesómero, racemato, enantiómero, diastereómero, compuesto deuterado, profármaco o una mezcla de los mismos,



I

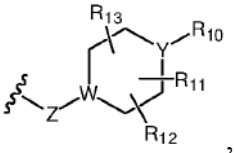
en donde R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo C_1-C_6 no sustituido, o un grupo hidrocarburo C_1-C_6 sustituido por uno o

más sustituyentes seleccionados del grupo hidrocarburo C_1-C_6, cicloalcano C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxilo, halógeno, ciano, $-NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$, $-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$ or $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}OR_8$;

o dos cualquiera de R_1, R_2 y R_3, junto con los átomos de C a los cuales están unidos respectivamente, forman un anillo de 3 a 7 miembros saturado o insaturado;

R_4 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y halógeno, y al menos uno de R_4 y R_5 es halógeno;

R_6 se selecciona del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxilo o halógeno;

R_7 es 

, en donde Z es carbonilo, O, S, imino, sulfonilo o $-(CH_2)_n-$, n es un número entero de 0 a 4; W e Y son cada uno independientemente C, N, O o S, pero W e Y no pueden ser ambos C al mismo tiempo, y cuando Z es O ó S, W es C; R_{10}, R_{11}, R_{12} y R_{13} se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxilo, halógeno, ciano, $-NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$, $-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$ or $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}OR_8$, y cuando Y = N, R_{10} no puede ser NH_2, $-NHR_8$, $-NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$, $-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$ or $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}OR_8$; o

R_6 y R_7 junto con los átomos de C a los cuales están unidos forman un heterociclo de 5 a 7 miembros que contiene uno o más átomos seleccionados de N, O o S, y el heterociclo de 5 a 7 miembros está sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6, hidroxilo, halógeno, ciano, $-NH_2$, $-NHR_8$, $-NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}NR_8R_9$, $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$, $-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}R_8$ or $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}OR_8$;

En donde R_8 y R_9 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 y hidroxialquilo C_1-C_6.

Preferiblemente, R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo C_1-C_6 no sustituido o un grupo hidrocarburo C_1-C_6 sustituido

por uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo hidrocarburo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxilo o halógeno.

Más preferiblemente, R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, un grupo hidrocarburo C_1-C_6 no sustituido o un grupo hidrocarburo C_1-C_6 sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo hidrocarburo C_1-C_6, hidroxilo o halógeno.

Más preferiblemente, R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 no sustituido lineal o ramificado, alquenilo C_2-C_4 no sustituido lineal o ramificado.

Muy preferiblemente, R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_4 no sustituido lineal o ramificado.

Como otra modalidad preferida, R_2 y R_3, junto con los átomos de C a los que ambos están unidos, forman un anillo de 3 a 7 miembros saturado o insaturado.

Más preferiblemente, R_2 y R_3, junto con los átomos de C a los que ambos están unidos, forman un anillo saturado de 3 a 7 miembros.

Preferiblemente, R_4 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, flúor o cloro, y al menos uno de R_4 y R_5 es flúor o cloro.

Más preferiblemente, R_4 y R_5 son cada uno independientemente hidrógeno o flúor, y al menos uno de R_4 y R_5 es flúor.

Más preferiblemente, R_4 es hidrógeno o flúor, y R_5 es flúor.

Preferiblemente, R_6 se selecciona de un átomo de hidrógeno o alquilo C_1-C_6.

Preferiblemente, Z es un grupo carbonil, O, o $-(CH_2)_n-$, n es un número entero de 0 a 4.

Mas preferiblemente, Z es $-(CH_2)_n-$, n es un número entero de 0 a 2, más preferiblemente, n= 0 o 1.

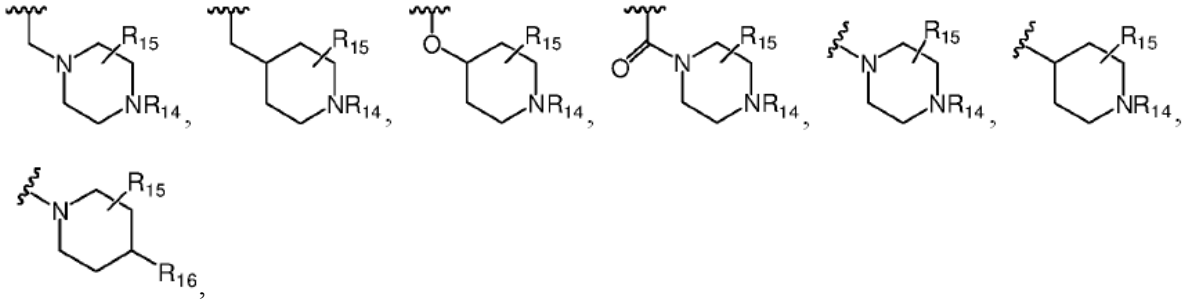
Preferiblemente, W e Y se seleccionan cada uno independientemente de C o N, pero W e Y no pueden ser ambos C al mismo tiempo.

Preferiblemente, R_{10}, R_{11}, R_{12} y R_{13} se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxilo, o $-NR_8R_9$, y cuando Y = N, R_{10} no puede ser $-NR_8R_9$, en donde R_8 y R_9 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrogeno y alquilo C_1-C_4.

Más preferiblemente, R_{10}, R_{11}, R_{12} y R_{13} se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrogeno, alquilo C_1-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6, haloalquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 o

$-NR_8R_9$, en donde R_8 y R_9 son independientemente seleccionados de un átomo de hidrogeno y alquilo C_1-C_4.

Más preferiblemente, R_7 se selecciona de los sustituyentes que tienen las siguientes estructuras:



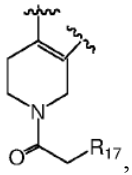
En donde R_{14} y R_{15} se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrogeno, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6 or hidroxilo; R_{16} se selecciona de un átomo de hidrógeno, cicloalquilo C_3-C_6, haloalquilo C_1-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6, alcoxi C_1-C_6, hidroxilo, o $-NR_8R_9$, en donde R_8 y R_9 se seleccionan independientemente de un átomo de hidrogeno y alquilo C_1-C_4.

Más preferiblemente, R_{14} y R_{15} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrogeno, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, y hidroxialquilo C_1-C_6; R_{16} se selecciona de un átomo de hidrogeno, alquilo C_1-C_6, cicloalquilo C_3-C_6, hidroxialquilo C_1-C_6 o $-NR_8R_9$, en donde R_8 y R_9 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrogeno y alquilo C_1-C_4.

Como otra modalidad preferida, R_6 y R_7 junto con los átomos de C a los cuales están unidos forman un heterociclo de 6 miembros que contiene uno o más átomos seleccionados de N, O o S.

Más preferiblemente, R_6 y R_7 junto con los átomos de C a los cuales están unidos forman un heterociclo de 6 miembros que contiene N.

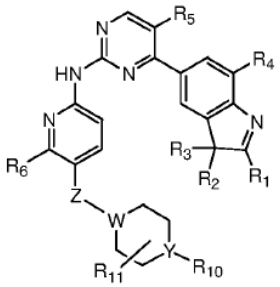
Más preferiblemente, R_6 y R_7 junto con los átomos de C a los que están unidos forman la siguiente estructura química:



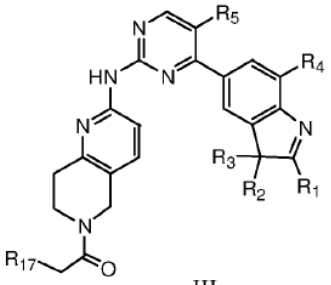
, en donde R_{17} se selecciona de hidroxil o alcoxi C_1-C_3; aún más preferiblemente, R_{17} es hidroxilo.

Como una modalidad preferida, la presente invención proporciona además los compuestos de fórmula estructural II, III, IV o V, o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos,

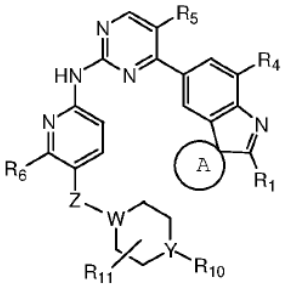
enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula II, III, IV o V o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos,



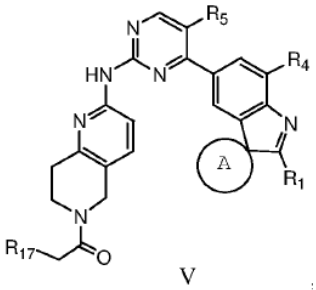
II ,



III ,



IV ,

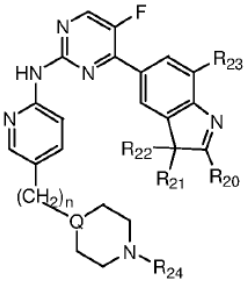


V

en donde Z, W, Y, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_{10}, R_{11} y R_{17} se definen como de describió anteriormente, el anillo A es un anillo saturado de 3 a 7 miembros.

Preferiblemente, el anillo A es un anillo saturado de 3 a 6 miembros.

Más preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula estructural VIII, o un tautómero, un mesómero, un racemato, un enantiómero, un diastereómero, un compuesto deuterado, un profármaco, o una mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula estructural VIII o su tautómero, mesómero, racemato, enantiómero, diastereómero, compuesto deuterado, profármaco o una mezcla de los mismos,

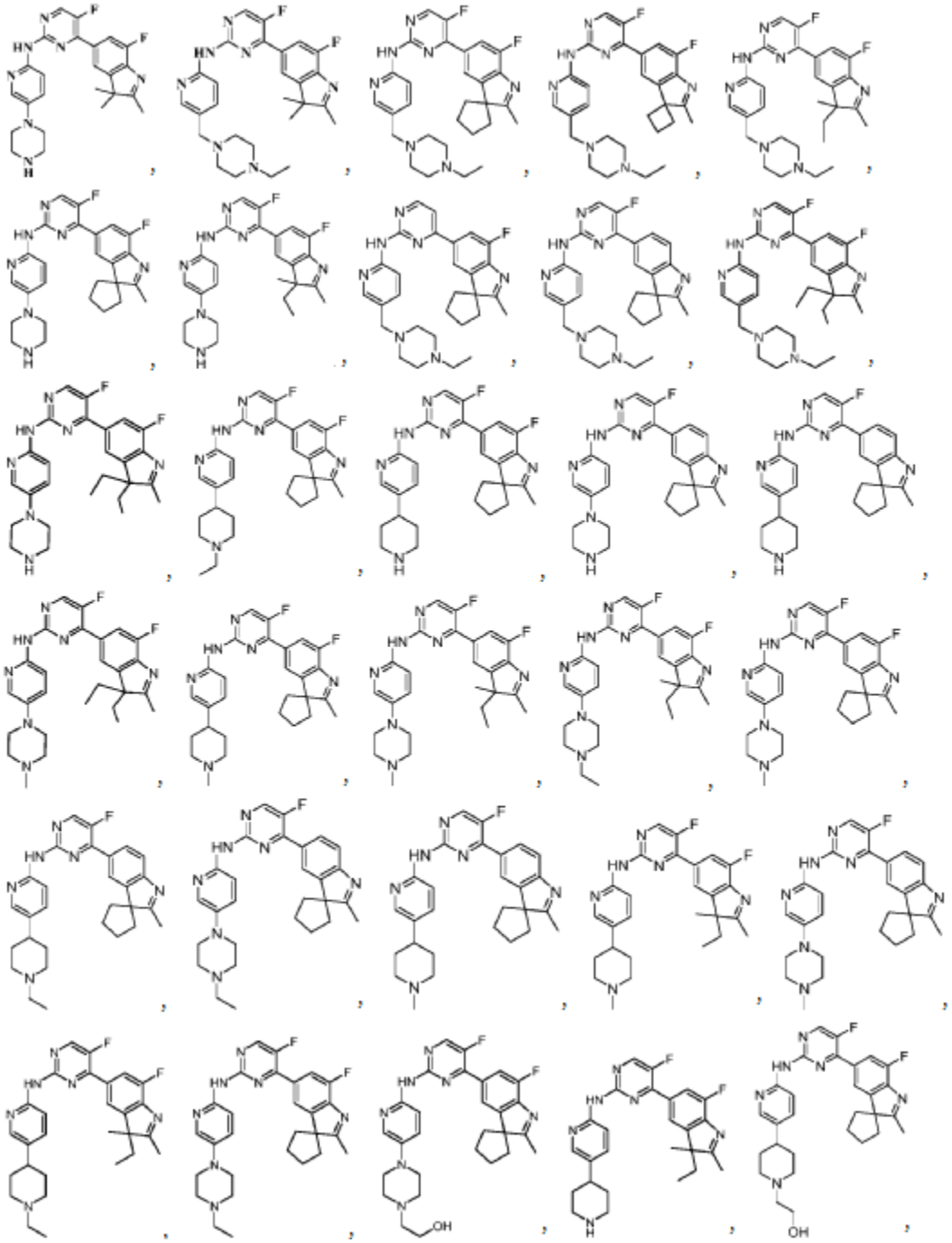


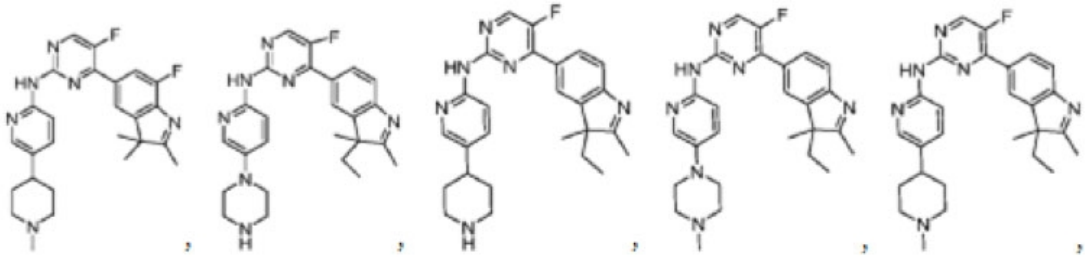
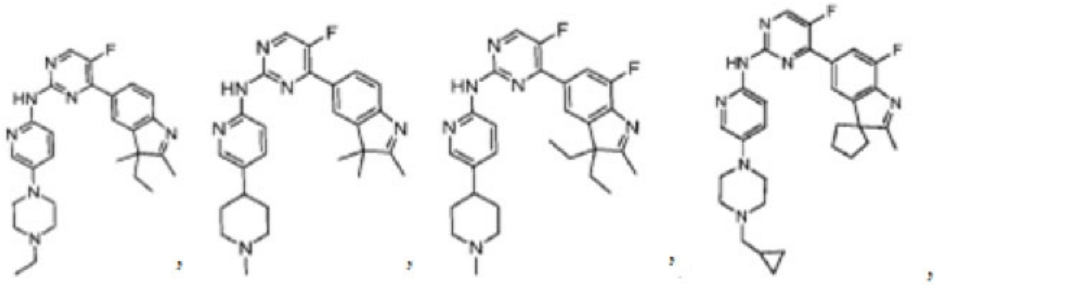
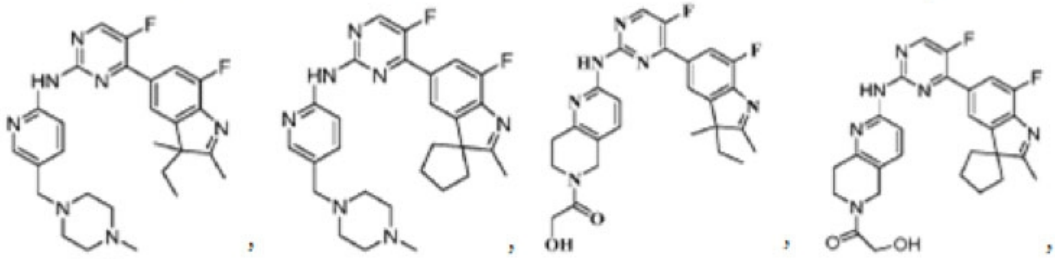
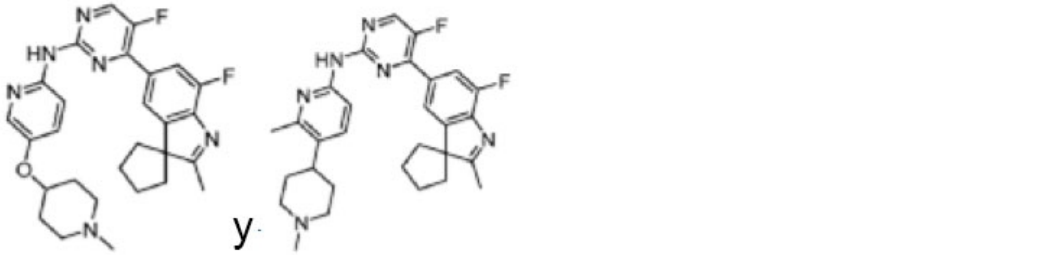
VIII

en donde R_{20}, R_{21}, R_{22} se seleccionan cada uno independientemente de alquilo C_1-C_4, o R_{20}

es alquilo C_1-C_4, y R_{21} y R_{22} junto con los átomos de C a los cuales están unidos forman un anillo saturado de 5 a 6 miembros; R_{23} se selecciona de hidrógeno o flúor; n = 0 o 1; R_{24} se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_4 o hidroxialquilo C_1-C_4, Q es C o N.

Como una modalidad más preferible, la presente invención proporciona compuestos de las siguientes estructuras, o un tautómero, un mesómero, un racemato, un enantiómero, un diastereómero, un compuesto deuterado, un profármaco, o una mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos de las estructuras o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos,

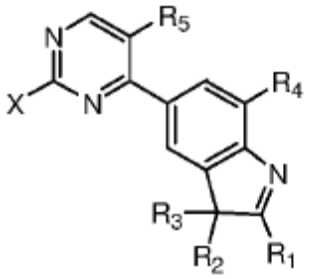


y

Los compuestos de acuerdo con la presente invención también incluyen todos los compuestos mencionados anteriormente que están marcados isotópicamente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona además un compuesto de fórmula estructural VI, o un tautómero, un mesómero, un racemato, un enantiómero, un diastereómero, un compuesto deuterado, un profármaco o una mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula estructural VI o su tautómero, mesómero, racemato, enantiómero, diastereómero, compuesto deuterado, profármaco o una mezcla de los mismos,

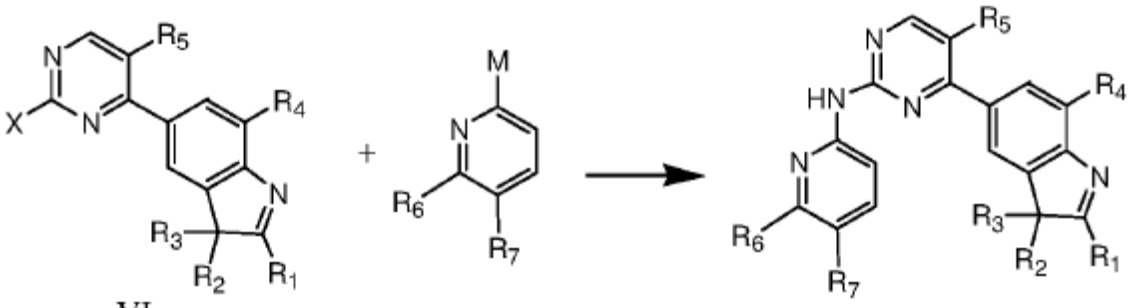


VI

en donde R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 se definen como anteriormente, X es un grupo saliente o un grupo amino.

Preferiblemente, X es halógeno o amino, más preferiblemente flúor, bromo, cloro o amino.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el compuesto de fórmula estructural I, que comprende llevar a cabo una reacción de acoplamiento catalizada por paladio entre un compuesto de fórmula VI y un compuesto de fórmula VII en un solvente para dar un compuesto de fórmula I ,



VI VII I

en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 se definen como anteriormente; X y M son cada uno independientemente un grupo saliente o amino, solo uno de X y M es amino y uno de los dos debe ser amino;

preferiblemente, el grupo saliente es halógeno;

más preferiblemente, el grupo saliente es flúor, bromo o cloro.

En donde, el método de preparación anterior puede comprender además la eliminación del grupo protector.

En donde, el método de preparación anterior puede comprender además la separación y/o purificación del producto, y la separación y/o purificación se puede llevar a cabo mediante un método generalmente usado en síntesis orgánica, por ejemplo, una combinación adecuada de los métodos de filtración, extracción, lavado, concentración, cromatografía y similares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII, o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros,

diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos, en la fabricación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular .

Preferiblemente, la formulación farmacéutica comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, el trastorno proliferativo celular se refiere a cáncer de mamífero o humano, más preferiblemente se refiere a cáncer humano, incluyendo tumores malignos sólidos y tumores malignos no sólidos, incluyendo específicamente, pero sin limitarse a cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, leucemia, cáncer del cerebro, cáncer gástrico y glioma.

Preferiblemente, el trastorno proliferativo celular también puede ser SIDA, aterosclerosis y reestenosis después del implante de un *stent* vascular.

Preferiblemente, dicho uso se refiere al uso de los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII, o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos, como el único ingrediente activo o en combinación con otras sustancias biológicamente activas, en la fabricación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular.

Las otras sustancias biológicamente activas incluyen, pero no están limitadas a: agentes anticancerígenos, agentes inmunosupresores y agentes antivirales; en donde el agente anticancerígeno se selecciona de un agente alquilante (tal como ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, semustina, clorhidrato de mecloretamina, busulfano, clorambucilo, melfalán, nitrocafano, formilmelfalano, carmustina, lomustina, altretamina, dibromomanitol, temozolomida, y similares), fármacos antineoplásicos antimetabolito (tales como citarabina, fluorouracilo, metotrexato, hidroxiurea, tegafur, meisoindigo, mercaptopurina y similares), agente complejante de platino (tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y similares), fármacos antineoplásicos antibióticos (actinomicina D, mitomicina, doxorrubicina, pingyangmicina, epirrubicina, pirarrubicina, daunorrubicina, bleomicina y similares), fármacos antineoplásicos de origen natural (homoharringtonina y sus derivados, vincristina y sus derivados, hidroxicamptotecina y sus

derivados, etopósido y sus derivados, vindesina y sus derivados, vinblastina y sus derivados, bitartrato de vinorelbina, taxol y sus derivados, colchicina y sus derivados, elemeno y sus derivados y similares), fármacos antineoplásicos hormonales (tales como aminoglutetimida, tamoxifeno, dexametasona, dutasterida, flutamida, gonadorelina, acetato de leuprolida, letrozol y similares), inhibidores de VEGFR o EGFR (tales como sunitinib, sorafenib, imatinib, gefitinib, erlotinib, vandetanib, pazopanib, lapatinib, canertinib, afatinib, mubritinib, dasatinib, neratinib y similares), fármacos antineoplásicos de anticuerpos (como trastuzumab, pertuzumab, rituximab, panitumumab, bevacizumab, ipilimumab, ofatumumab, ramucirumab y similares), inhibidores de mTOR (tales como everolimus, sirolimus, zotarolimus y similares), y fármacos para tratar tumores cerebrales, tales como temozolomida y similares.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de combinación para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, en donde el producto de combinación comprende uno o más compuestos seleccionados de los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII, o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuesto deuterado, profármaco o mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos.

Preferiblemente, el producto de combinación incluye adicionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables, y / o el producto de combinación es un kit.

En otro aspecto, la presente invención proporciona además un método para tratamiento de un trastorno proliferativo celular, que comprende administrar a un paciente que lo necesita, por vía oral o no oral, una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención o el producto de combinación mencionado anteriormente.

Preferiblemente, el método anterior para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular comprende administrar a un paciente, por vía oral o no oral, una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención y de dichas otras sustancias biológicamente activas. Dichas otras sustancias biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, agentes anticancerígenos, agentes inmunosupresores y agentes antivirales; en donde el agente anticanceroso se selecciona de un agente alquilante (tal como ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, semustina, clorhidrato de mecloretamina, busulfano, clorambucilo, melfalán, nitrocafano, formilmelfalano, carmustina, lomustina, altretamina, dibromomanitol, temozolomida y similares), fármacos antineoplásicos antimetabolitos (como citarabina, fluorouracilo, metotrexato, hidroxiurea, tegafur, meisoindigo,

mercaptopurina y similares), agente complejante de platino (como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), fármacos antineoplásicos antibióticos (actinomicina D, mitomicina, doxorrubicina, pingyangmicina, epirrubicina, pirarrubicina, daunorrubicina, bleomicina y similares), fármacos antineoplásicos de origen natural (homoharringtonina y sus derivados, vincristina y sus derivados, hidroxicamptotecina y sus derivados, etopósido y sus derivados, vindesina y sus derivados, vinblastina y sus derivados, bitartrato de vinorelbina, taxol y sus derivados, colchicina y su derivados, elemeno y sus derivados y similares), fármacos antineoplásicos hormonales (como aminoglutetimida, tamoxifeno, dexametasona, dutasterida, flutamida, gonadorelina, acetato de leuprolida, letrozol y similares), inhibidores de VEGFR o EGFR (como sunitinib, sorafenib, imatinib, gefitinib, erlotinib, vandetanib, pazopanib, lapatinib, canertinib, afatinib, mubritinib, dasatinib, neratinib y similares), fármacos antineoplásicos de anticuerpos (tales como trastuzumab, pertuzumab, rituximab, panitumumab, bevacizumab, ipilimumab, ofatumumab, ramucirumab y similares), inhibidores de mTOR (tales como everolimus, sirolimus zotarolimus y similares) y fármacos para el tratamiento de tumores cerebrales, tales como temozolomida y similares.

La vía oral o no oral se puede administrar al paciente oralmente o mediante inyección, parche, pulverización y una o más rutas conocidas. La cantidad efectiva puede incluir una cantidad efectiva para tratar, reducir, moderar, aliviar, eliminar uno o más síntomas de una afección que se busca tratar o, que alternativamente se trata de evitar, o una cantidad efectiva para generar adicionalmente cambios ventajosos clínicamente identificables en la condición o en su efecto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos, en donde la fórmula estructural del compuesto es una o más fórmulas estructurales seleccionadas del grupo que consiste en las fórmulas estructurales I - V y VIII;

preferiblemente, el trastorno proliferativo celular se refiere a cáncer de mamífero o humano, más preferiblemente se refiere a cáncer humano, incluyendo tumores malignos sólidos y tumores malignos no sólidos, incluyendo específicamente, pero sin limitarse a, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, leucemia, cáncer del cerebro, glioma y cáncer gástrico; y/o

el trastorno proliferativo celular es una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en SIDA, aterosclerosis y reestenosis después del implante de un *stent* vascular.

En la descripción de la presente invención, a menos que se especifique lo contrario, el "alquilo C_1-C_6" se refiere a un alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado; el "alquilo C_1-C_4 " se refiere a un alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado, preferiblemente metil, etil, propil o isopropil. El "alcoxi C_1-C_6" se refiere a un alcoxi C_1-C_6 lineal o ramificado, preferiblemente un alcoxi C_1-C_4 lineal o ramificado, más preferiblemente metoxi, etoxi, propoxi o 2-metiletoxi. El "cicloalquilo C_3-C_6 " se refiere a un cicloalquilo C_3-C_6 no sustituido o un cicloalquilo C_3-C_6 sustituido con alquilo C_1-C_4 y/o alcoxi C_1-C_4, preferiblemente cicloalquilo C_3-C_6 no sustituido o cicloalquilo C_3-C_6 sustituido con C_1-C_4 alquilo y / o alcoxi C_1-C_4, más preferiblemente ciclopropil, ciclobutil, metilciclopropil, ciclopentil o ciclohexil. El "halógeno" se refiere a bromo, cloro o flúor. El "haloalquilo C_1-C_6 " se refiere a alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado sustituido con bromo, cloro o flúor, preferiblemente alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado sustituido con cloro o flúor, más preferiblemente monofluorometil, difluorometil, trifluorometil, monocloroetil, dicloroetil, triclorometil, 1-fluoroetil, 1-cloropropil, 1-cloroetil y 1-cloropropil.

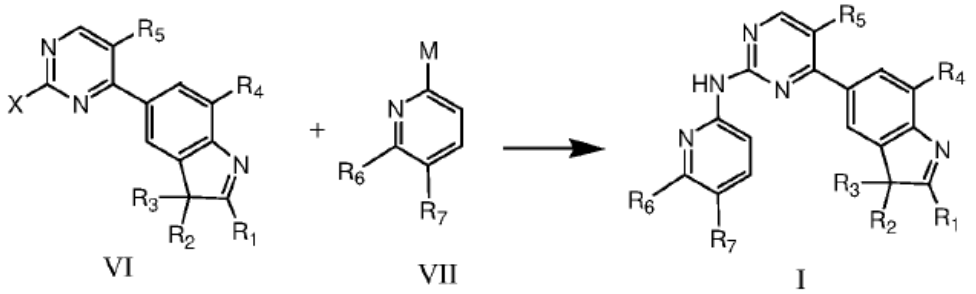
La investigación existente sugiere que la toxicidad de los inhibidores de las CDK está relacionada principalmente con su inhibición de CDK1 y otras proteínas quinasas, como Pim-1, una treonina/serina quinasa codificada por un protooncógeno del mismo nombre. Por lo tanto, como compuestos inhibidores de CDK, se espera que tengan una diferencia más significativa entre el efecto sobre CDK4/CDK6 y sobre CDK1 y otras quinasas, es decir, la inhibición selectiva de CDK4/CDK6. Los compuestos proporcionados por la presente invención son superiores o comparables en actividad a LY2835219, un candidato que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase III, y algunos compuestos exhiben una mejor selectividad de quinasas. Además, el compuesto preferido (preparado en el Ejemplo 17) se absorbe bien por vía oral y tiene una buena distribución hematoencefálica. Los resultados anteriores indican que los compuestos de la presente invención son prometedores para ser desarrollados en nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la proliferación celular, especialmente tumores malignos, especialmente cáncer cerebral.

Descripción detallada de la invención

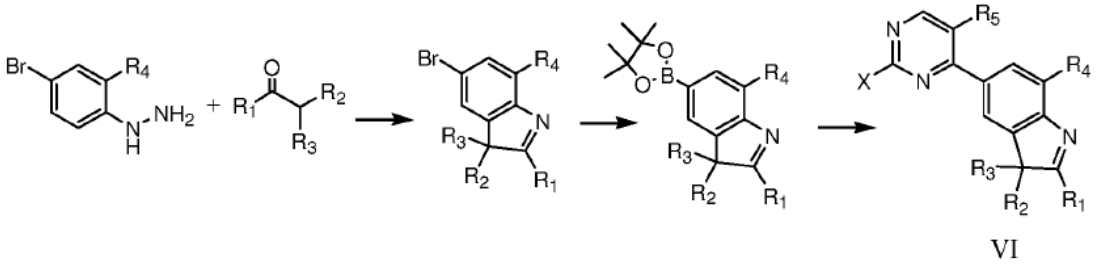
La presente invención se describe a continuación con referencia a ejemplos específicos. Un experto en la materia entenderá que estos ejemplos son meramente ilustrativos de la invención y

no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Los compuestos de fórmula VI de la invención son intermedios clave para la síntesis de los compuestos de fórmula I, y son sometidos a una reacción de acoplamiento catalizada por paladio con los compuestos de fórmula VII en un solvente para producir los compuestos de fórmula I.



Los compuestos de fórmula VI pueden ser sintetizados mediante el siguiente esquema de reacción:



en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6 y R_7 se definen como anteriormente; X es un grupo saliente o un grupo amino.

Preferiblemente, R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, grupo hidrocarburo C_1-C_6 no sustituido, o un grupo hidrocarburo C_1-C_6 sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo hidrocarburo C_1-C_6, hidroxilo o halógeno.

Más preferiblemente R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado no sustituido, alquenilo C_2-C_4 lineal o ramificado no sustituido.

Muy preferiblemente, R_1, R_2 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un átomo de hidrogeno, alquilo C_1-C_4 lineal o ramificado no sustituido.

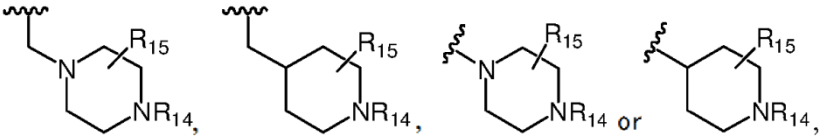
Alternativamente, como otro modo preferido, R_1 se define como anteriormente, y R_2 y R_3 junto con el átomo de C al que están unidos forman un anillo de 3 a 7 miembros saturado o insaturado; más preferiblemente, R_2 y R_3 junto con el átomo de C al que están unidos forman un anillo de 3 a 7 miembros saturado.

Preferiblemente, R_4 y R_5 se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o flúor, y al menos uno de R_4 y R_5 es flúor.

X es preferiblemente halógeno o amino, más preferiblemente flúor, bromo, cloro o amino.

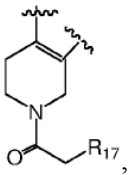
R_6 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o alquilo C_1-C_4.

R_7 es preferiblemente un sustituyente de la siguiente estructura:



En donde, R_{14} y R_{15} se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un átomo de hidrogeno, alquilo C_1-C_4 y hidroxialquilo C_1-C_4.

Alternativamente, como otra modalidad preferida, R_6 y R_7 junto con el átomo de C al que están unidos forman una estructura química como la siguiente:



, en donde, R_{17} se selecciona de hidroxil o alcoxi C_1-C_3; mas preferiblemente, hidroxil.

A menos que se especifique lo contrario, todos los métodos experimentales en los siguientes ejemplos son métodos convencionales. A menos que se especifique lo contrario, las materias primas químicas, reactivos y similares usados en los siguientes ejemplos son productos que están disponibles comercialmente.

Las abreviaturas y sus significados que aparecen en los ejemplos de la presente invención se dan de la siguiente manera:

PE: (*petroleum ether*) éter de petróleo

EA: (*Ethyl acetate*) Acetato de etilo

DCM: diclorometano

MeOH: metanol

Pd (dppf)Cl_2: [1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno] dicloruro de paladio

Pd $(PPh_3)_4$: tetrakis (trifenilfosfina) paladio

$Pd_2(dba)_3$: Tris (dibencilidenacetona) dipaladio

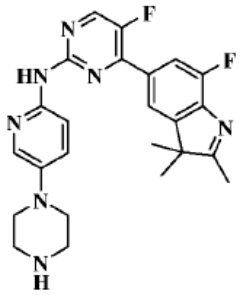
$NaHB(OAc)_3$: triacetoxiborohidruro de sodio

LHMDS: hexametildisilazida de litio

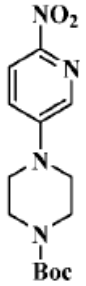
DAPI: Colorante fluorescente DAPI

Ejemplo 1

5-fluoro-4- (7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il) -N- (5- (piperazin-1-il) piridin-2-il) pirimidina-2- amino



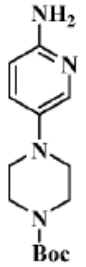
Paso 1: Éster t-butílico del ácido 4- (6-nitropiridin-3-il) piperazina-1-carboxílico



Se cargó un matraz de reacción con 5-bromo-2-nitropiridina (5.0 g, 24.63 mmol), éster t-butílico de ácido piperazin-1-carboxílico (5.04 g, 27.09 mol), acetonitrilo (30 ml) y diisopropiletilamina (4.77 g, 36.94 mmol). La mezcla se dejó reaccionar bajo reflujo durante 2 h. El producto de reacción se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el solvente, y se separó por cromatografía en columna (PE / EA = 1: 1 a DCM / MeOH = 20: 1) para obtener el compuesto del título (3.8 g, solido amarillo).

MS (ESI): masa calculada para $C_{14}H_{20}N_4O_4$ 308.1, m/z encontrado 309.1 $[M+H]^+$.

Paso 2: Éster t-butílico del ácido 4- (6-aminopiridin-3-il) piperazina-1-carboxílico

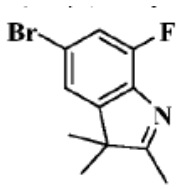


Se cargó un matraz de reacción con éster t-butílico del ácido 4- (6-nitropiridin-3-il) piperazina-1-carboxílico (0.92 g, 3.0 mmol) preparado en el Paso 1, acetato / metanol de etilo (10 ml / 10 ml) y Pd / C (0,1 g), y se introdujo con gas de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo a

temperatura ambiente durante 2 h. El producto de reacción se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título (792 mg, sólido blanquecino).

MS (ESI): masa calculada para $C_{14}H_{22}N_4O_2$ 278.2, m/z encontrado 279.2 $[M+H]^+$.

Paso 3: Preparación de 5-bromo-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol

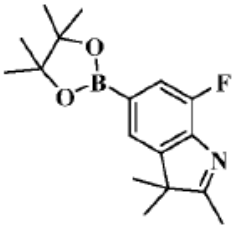


Se cargó un matraz de reacción con hidrocloruro de (4-bromo-2-fluorofenil) hidracina (1.0 g, 4.14 mmol), ácido acético (10 ml) y 3-metil-2-butanona (0.32 g, 4.14 mmol). La mezcla se dejó reaccionar bajo reflujo durante 5 h. El producto de reacción se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el solvente, se le agregaron 20 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces (20 ml por cada vez). La fase orgánica combinada se lavó una vez con 25 ml de solución acuosa de cloruro de sodio saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se sometió a evaporación rotatoria y se separó por cromatografía en columna (DCM: MeOH = 50:1 a 25:1) para obtener el compuesto titulado (420 mg, sólido amarillo).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.23-7.21 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.32 (s, 6H).

MS (ESI): m/z 258.0 $[M+H]^+$.

Paso 4: Preparación de 7-fluoro-2,3,3-trimetil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan -2-il)-3H-indol

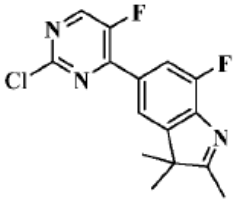


Se cargó un matraz de reacción con 5-bromo-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol (400.0 mg, 1.56 mmol) preparado en el Paso 3, 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bis (1,3,2-dioxaborolano) (436.5 mg, 1.71 mmol), acetato de potasio (306.3 mg, 3.12 mmol), dioxano (10 ml) y Pd (dppf) Cl_2 (228.7 mg, 0.32 mmol). La mezcla se calentó a 90ºC bajo la protección de gas nitrógeno, y se dejó reaccionar durante la noche. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se le agregaron 10 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces (20 ml por cada vez). La fase orgánica del acetato de etilo se combinó, se lavó una vez con 25 ml de solución salina saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró y se separó mediante

cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: MeOH = 50: 1-30: 1) para obtener el compuesto titulado (306.5 mg, aceite amarillo)

MS (ESI): m/z 304.1 $[M+H]^+$.

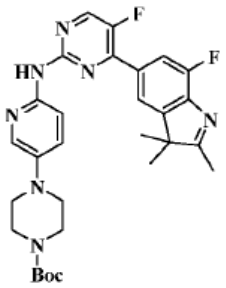
Paso 5: Preparación de 5-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H- indol



Se cargó un matraz de reacción de microondas con 7-fluoro-2,3,3-trimetil-5- (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) -3H-indol (300 mg, 0.99 mmol) preparado en el paso 4, 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina (181.8 mg, 1.08 mmol), fosfato de potasio (419.8 mg, 1.98 mmol), dioxano / agua (4 ml / 1 ml) y Pd ($PPh_3)_4$ (114.5 mg, 0.09 mmol). La reacción de microondas se llevó a cabo bajo la protección de gas nitrógeno a 130 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se le agregaron 10 ml de agua y se extrajo con diclorometano tres veces (15 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 20 ml de solución acuosa de cloruro de sodio saturada, luego se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se sometieron a evaporación rotatoria y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM: MeOH = 100: 1-50: 1) para obtener el compuesto titulado (301.2 mg, sólido amarillo).

MS (ESI): masa calculada para $C_{15}H_{12}ClF_2N_3$ 307.1, m/z encontrado 308.1 $[M+H]^+$.

Paso 6: Preparación de éster butílico del acido 4-(6-((5-fluoro-4-(7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il)pirimidin -2-il)amino)piridin-3-il)piperazina-1-carboxilico

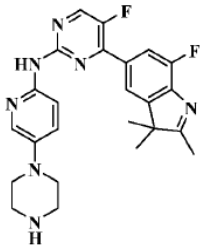


Se cargó un matraz de reacción con 5-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol (150.0 mg, 0.48 mmol) preparado en el Paso 5, éster t-butílico del ácido 4-(6-aminopiridin-3-il) piperazina-1-carboxílico (135.8 mg, 0.48 mmol) preparado en el paso 2, carbonato de cesio (371.6 mg, 0.96 mmol), dioxano (3 ml), $Pd_2(dba)_3$ (44.7 mg, 0.05 mmol) y 4,5-bis (difenilfosfino) -9,9-dimetilxanteno (30.4 mg, 0.05 mmol). La mezcla se calentó a 150 °C bajo

la protección de gas nitrógeno para llevar a cabo la reacción de microondas durante 1 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se le agregaron 10 ml de agua y se extrajo con diclorometano tres veces (10 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 30 ml de solución acuosa de cloruro de sodio saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM / MeOH = 50: 1) para obtener el compuesto titulado (53.4 mg, sólido amarillo).

MS (ESI): masa calculada para $C_{29}H_{33}F_2N_7O_2$ 549.3, m/z encontrado 550.3 $[M+H]^+$.

Paso 7: Preparación de 5-fluoro-4-(7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il)-N-(5-(piperazin -1-il)piridin-2-il)pyrimidina-2-amino trifluoroacetato



Se cargó un matraz de reacción con éster t-butílico del ácido 4- (6 - ((5-fluoro-4- (7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il) pirimidin-2-il) amino) piridina-3-il) piperazina-1-carboxílico (30.0 mg, 0.054 mmol) preparado en el paso 6, diclorometano (4 ml) y ácido trifluoroacético (1 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h . El producto de reacción se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el solvente, se ajustó a pH 8 con solución acuosa de bicarbonato de sodio saturada y se extrajo con diclorometano tres veces (5 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con 10 ml de solución acuosa de cloruro de sodio saturada una vez, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se sometieron a evaporación rotatoria y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM / MeOH = 20: 1) para obtener el compuesto titulado (10.5 mg, sólido amarillo).

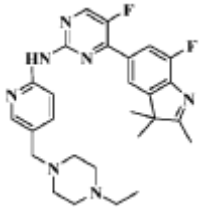
^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d_6) δ9.75(br s, 1H), 8.65(d, 1H, J=3.2Hz), 8.02-7.94(m, 3H), 7.82(d, 1H, J=10.8Hz), 7.43(d, 1H, J=8.8Hz), 3.09-3.02(m, 4H), 2.84-2.83(m, 4H), 2.31(s, 3H), 1.34(s, 6H).

MS(ESI): masa calculada para $C_{24}H_{25}F_2N_7$ 449.50, m/z encontrado 450.2$[M+H]^+$.

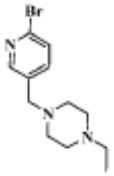
Ejemplo 2

N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-

5-il)pirimidina-2-amino



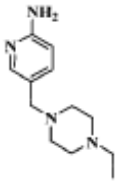
Paso 1: 1-((6-bromopiridin-3-il)metil)-4-etilpiperazina



Se añadieron 2-bromo-5-formilpiridina (1.5 g, 8.15 mmol), 1-etilpiperazina (0.93 g, 8.15 mmol) y diclorometano (15 ml) al matraz de reacción, y luego se agregó NaHB $(OAc)_3$ (2.58 g, 12.23 mmol) en lotes. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante la noche. El producto de reacción se filtró, se concentró y se separó mediante cromatografía en columna (DCM / MeOH = 100: 1 a 10: 1) para obtener el producto titulado (1.64 g, aceite amarillo).

MS (ESI): masa calculada para $C_{12}H_{18}BrN_3$ 285.1, m/z encontrado 286.1 $[M+H]^+$.

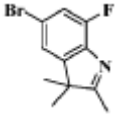
Paso 2: 5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridina-2-amino



Se cargó un matraz de reacción con 1 - ((6-bromopiridin-3-il) metil) -4-etilpiperazina (2.84 g, 10 mmol) preparado en la Etapa 1, 2- (diciclohexilfosfino) bifenilo (700 mg, 2 mmol), Pd_2 $(dba)_3$ (915 mg, 1 mmol) y tolueno (30 ml), se añadió LHMDS (1 N) (20 ml, 20 mmol) bajo la protección de gas nitrógeno. La mezcla se calentó a 80 ºC y se dejó reaccionar durante la noche, luego se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se concentró y se separó mediante cromatografía en columna (DCM / MeOH = 100: 1-10: 1) para dar 1.52 g del producto titulado (sólido marrón).

MS (ESI): masa calculada para $C_{13}H_{21}N_3$ 220.2, m/z encontrado 221.2 $[M+H]^+$.

Paso 3: Preparación de 5-bromo-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol

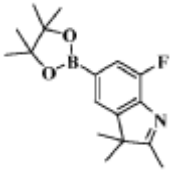


Se añadieron (4-bromo-2-fluorobenceno) hidracina (900.0 mg, 3.73 mmol), ácido acético (5 ml) y 3-metilbutan-2-ona (353.3 mg, 4.09 mmol) al matraz de reacción. La mezcla se dejó

reaccionar a reflujo durante 5 h. El producto de reacción se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el disolvente, se agregaron 10 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces (20 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 25 ml de solución acuosa de cloruro de sodio saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se sometieron a evaporación rotatoria. El residuo se separó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo: éter de petróleo = 1: 50-1: 25) para producir 910 mg del compuesto titulado (sólido amarillo).

MS (ESI): m/z 258.0 $[M+H]^+$.

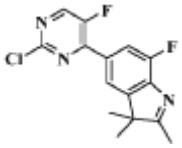
Paso 4: Preparación de 7-fluoro-2,3,3-trimetil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan -2-il)-3H-indol



El compuesto 5-Bromo-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol (1.0 g, 3.91 mmol) preparado en el Paso 3, 4,4,4',4',5,5,5', 5' -octametil-2,2'-bis (1,3,2-dioxaborolano) (1.09 g, 4.29 mmol), acetato de potasio (770 mg, 7,82 mmol), dioxano (10 ml), Pd (dppf)Cl_2 (570 mg, 0.78 mmol) se añadieron a un matraz de reacción, y se calentaron a 90 ºC bajo la protección de gas nitrógeno para reaccionar durante la noche. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se diluyó con 10 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces (20 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 25 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron, se sometieron a evaporación rotatoria y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EA: PE = 1: 100-1: 20) para dar 1.02 g del compuesto del título (aceite amarillo).

MS (ESI): m/z 304.2 $[M+H]^+$.

Paso 5: Preparación de 5-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H -indol

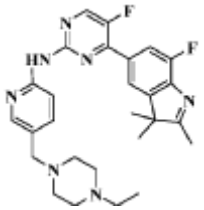


Se cargó un matraz de reacción de microondas con 7-fluoro-2,3,3-trimetil-5- (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) -3H-indol (1.0 g, 3.30 mmol) preparado en el Paso 4, 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina (610 mg, 3.63 mmol), fosfato de potasio (1.39 g, 6.60 mmol), dioxano

/ agua (8mL / 2mL), y Pd $(PPh_3)_4$ (380 mg, 0.33 mmol). La reacción de microondas se llevó a cabo a 130 °C bajo la protección de gas nitrógeno durante 1 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se le agregaron 10 ml de agua, se extrajo tres veces con diclorometano (15 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 20 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EA: PE = 1:50 a 1:10) para dar el compuesto titulado (290.0 mg, sólido amarillo).

MS (ESI): m/z 308.1 $[M+H]^+$.

Paso 6: Preparación de N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)-5-fluoro-4- (7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il)pirimidina-2-amino



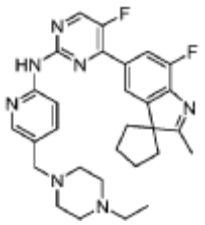
Se cargó un matraz de reacción con 5- (2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il) -7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol (290.0 mg, 0.94 mmol) preparado en el paso 5, 5- ((4-etilpiperazin-1-il) metil) piridin-2-amino (228.6 mg, 1.04 mmol) preparado en el paso 2, fosfato de potasio (400.5 mg, 1.88 mmol), 10 ml de dioxano, $Pd_2(dba)_3$ (86.4 mg, 0.09 mmol) y 4,5-bis (difenilfosfino) -9,9-dimetilxanteno (109.2 mg, 0.19 mmol). La reacción de microondas se llevó a cabo a 150 °C bajo la protección de gas nitrógeno durante 1 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se le agregaron 10 ml de agua, se extrajo tres veces con diclorometano (10 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 30 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se sometieron a evaporación rotatoria para eliminar el solvente y se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano: metanol = 30: 1) para producir el compuesto titulado (140.3 mg, sólido amarillo).

^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$) δ8.72(s,1H), 8.49(d,1H,J=3.2Hz), 8.38(d,1H,J=8.4Hz), 8.31(s,1H), 7.92(s,1H), 7.89(s,1H), 7.73(d,1H,J=8.4Hz), 3.52(s,2H), 2.54-2.41(m,10H), 2.38(s,3H), 1.40(s,6H), 1.10(t,3H,J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 492.2$[M+H]^+$.

Ejemplo 3

N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metilpiridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1, 3'-indol]-5'-il) pirimidina-2-amino



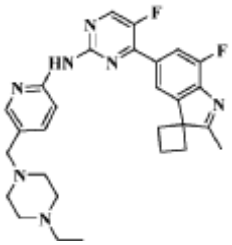
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$) δ9.75(s,1H), 8.54(d, 1H, J=3.2Hz), 8.38-8.37(m, 2H), 7.94(s, 1H), 7.87(d, 1H, J=10.8Hz), 7.68(d, 1H, J=8.4Hz), 3.49(s, 2H), 2.99-2.39(m, 10H), 2.37(s, 3H), 2.14-2.08(m, 6H), 1.87-1.84(m, 2H), 1.06(t,3H,J＝6.4Hz).

MS(ESI):m/z 518.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 4

N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclobutane-1,3'-indol]-5'-il) aminopirimidina-2-amino



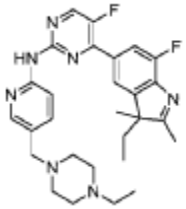
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$) δ8.36-8.32(m, 2H), 8.23(s, 1H), 8.04(s, 1H), 7.78-7.75(m, 2H), 7.71(d, 1H, J=8.4Hz), 5.84-5.83(m, 1H), 5.63-5.62(m, 1H), 4.39-4.38(m, 1H), 3.66-3.64(m, 1H), 3.51(s, 2H), 3.06-3.00(m, 1H), 2.71-2.38(m, 11H), 1.55(s, 3H), 1.11(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 504.3$[M+H]^+$

Ejemplo 5

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)-5-fluoropirimidina-2-amino



El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

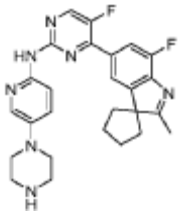
^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.71(s, 1H), 8.49(d, 1H, J=3.6Hz), 8.38(d, 1H, J=8.4Hz), 8.31(s, 1H), 7.94(d, 1H, J=11.2Hz), 7.86(s, 1H), 7.72(dd, 1H, J=8.0, 1.2Hz), 3.52(s, 2H), 2.53-

2.41(m, 10H), 2.34(s, 3H), 2.06-1.93(m, 1H), 1.91-1.84(m, 1H), 1.39(s, 3H), 1.09(t, 3H, J=7.2Hz), 0.50(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 506.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 6

5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



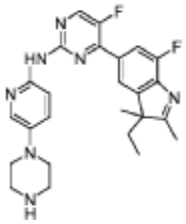
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 1.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.67(br s, 1H), 8.44(d, 1H, J=3.6Hz), 8.29(d, 1H, J=9.2Hz), 8.11(d, 1H, J=2.4Hz), 7.95(s, 1H), 7.89(d, 1H, J=10.8Hz), 7.36(dd, 1H, J=9.2, 2.8Hz), 3.12-3.06(m, 8H), 2.39(s, 3H), 2.16-2.10(m, 6H), 1.89-1.86(m, 2H).

MS(ESI):m/z 476.2$[M+H]^+$

Ejemplo 7

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



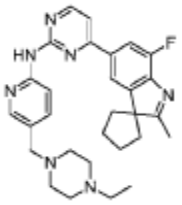
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 1.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.33(br s, 1H), 8.46(d, 1H, J=3.6Hz), 8.28(d, 1H, J=8.8Hz), 8.16(d, 1H, J=2.4Hz), 7.90(d, 1H, J=10.8Hz), 7.82(s, 1H), 7.35(dd, 1H, J=8.8Hz, 2.8Hz), 3.10-3.03(m, 8H), 2.31(s, 3H), 2.03-1.80(m, 3H), 1.36(s, 3H), 0.47(t, 6H, J=7.6Hz).

MS(ESI):m/z 464.2$[M+H]^+$.

Ejemplo 8

N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



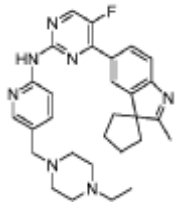
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.83(s, 1H), 8.61(d, 1H, J=5.2Hz), 8.49(d, 1H, J=8.8Hz), 8.32(d, 1H, J=1.2Hz), 7.91(d, 1H, J=1.2Hz), 7.78(d, 1H, J=10.8Hz), 7.78(dd, 1H, J=8.4, 1.6Hz), 7.21(d, 1H, J=5.2Hz), 3.52(s, 2H), 2.54-2.41(m, 10H), 2.38(s, 3H), 2.19-2.08(m, 6H), 1.90-1.87(m, 2H), 1.10(t, 3H, J=6.8Hz).

MS(ESI):m/z 500.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 9

N-(5-((4-etilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



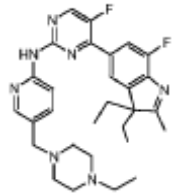
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.73(br s, 1H), 8.47(d, 1H, J=3.6Hz), 8.43(d, 1H, J=8.4Hz), 8.30(s, 1H), 8.15-8.13(m, 2H), 7.70-7.64(m, 2H), 3.52(s, 2H), 2.53-2.37(m, 10H), 2.31(s, 3H), 2.21-2.06(m, 6H), 1.89-1.86(m, 2H), 1.10(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 500.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 10

4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il)-N-(5-((4-etilpiperidin-1-il)metil)piridin-2-il)-5-fluoropirimidina-2-amino



El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

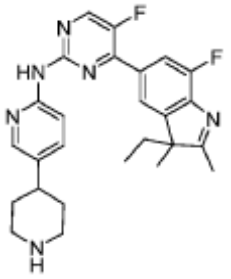
^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.19(br s, 1H), 8.53(s, 1H), 8.39-8.34(m, 2H), 7.95(d, 1H, J=11.2Hz), 7.83(s, 1H), 7.72(d, 1H, J=8.0Hz), 3.51(s, 2H), 2.52-2.41(m, 10H), 2.31(s, 3H), 2.06-

2.01(m, 2H), 1.90-1.85(m, 2H), 1.08(t, 3H, J=6.8Hz), 0.46(t, 6H, J=6.8Hz).

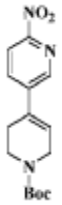
MS(ESI):m/z 520.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 11

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperidina-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



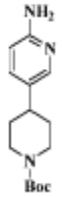
Paso 1: Ester t-butílico del ácido 6-Nitro-3',6'-dihidro-[3,4'-bipiridina]-1'(2'H)-carboxílico



Se cargó un matraz de reacción con 5-bromo-2-nitropiridina (20.3 g, 0.1 mol), éster t-butílico del ácido 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-5,6 -dihidropiridina-1 (2H)-carboxílico (31 g, 0.1 mol), dioxano / agua (250 ml / 30 ml), carbonato de cesio (66 g, 0.2 mol) y Pd (dppf)Cl_2 (7.33 g, 0.01 mol) y protegido por gas nitrógeno. La mezcla se calentó a 85 °C durante 12 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró y se separó mediante cromatografía en columna (PE / EA = 1: 1 a DCM / MeOH = 20: 1) para dar el producto titulado (11 g, sólido amarillo).

MS (ESI): masa calculada para $C_{15}H_{19}N_3O_4$ 305.1, m/z encontrado 306.1 $[M+H]^+$.

Paso 2: Ester t-butílico del ácido 4-(6-Aminopiridin-3-il)piperidina-1-carboxilico

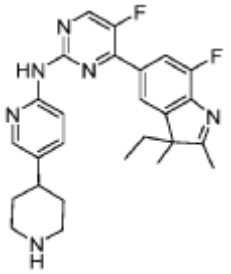


Se cargó un matraz de reacción con éster t-butílico del ácido 6-nitro-3',6'-dihidro-[3,4'-bipiridina]-1'(2'H)-carboxílico (0.9 g, 3.0 mmol) preparado en el paso 1, acetato de etilo / metanol (10 ml / 10 ml) y Pd / C (0.1 g). Se introdujo hidrógeno en la misma y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 h. El producto de reacción se filtró y se concentró para obtener

el producto titulado (790 mg, sólido blanquecino).

MS (ESI): masa calculada para $C_{15}H_{23}N_3O_2$ 277.2, m/z encontrado 278.2 $[M+H]^+$.

4-(3-Etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperidina-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



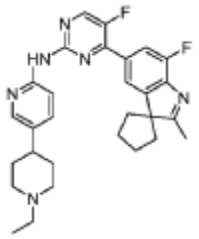
Otros pasos se llevaron a cabo de acuerdo con los pasos similares a los Pasos 3 - 7 del Ejemplo 1 para obtener el compuesto titulado de este ejemplo.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.61(br s, 1H), 8.46(d, 1H, J=3.6Hz), 8.34(d, 1H, J=8.8Hz), 8.26(d, 1H, J=1.6Hz), 7.93(d, 1H, J=11.2Hz), 7.64(d, 1H, J=8.0Hz), 7.86(s, 1H), 7.61(dd, 1H, J=8.4Hz, 2.0Hz), 3.24-3.21(m, 2H), 2.77(t, 1H, J=10.8Hz), 2.64-2.61(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.06-1.91(m, 4H), 1.89-1.84(m, 3H), 1.72-1.63(m, 2H), 1.39(s, 3H), 0.50(t, 1H, J=7.2Hz).

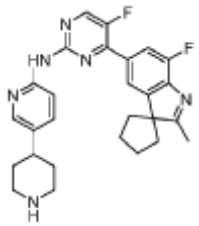
MS(ESI):m/z encontrado 463.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 12

N-(5-(1-etilpiperidin-4-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



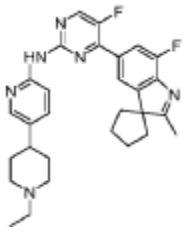
5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperidina-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



Este intermedio se obtuvo de acuerdo con un paso similar al del Ejemplo 11.

N-(5-(1-etilpiperidin-4-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-

indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



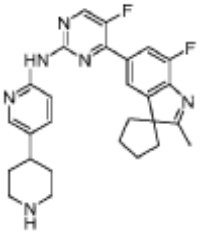
Se cargó un matraz de reacción con 5-fluoro-4- (7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol] -5'-il) -N- (5-(piperidina-4-il)) piridin-2-il) pirimidina-2-amino 50 mg (0.1 mmol) preparado en el paso anterior, acetaldehído 26 mg (0.6 mmol) y diclorometano 5 ml, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 0.5 h. Luego se añadió trietilborohidruro sódico 60 mg (0.28 mmol) y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 h. A la solución de reacción se le añadieron 20 ml de solución acuosa de carbonato de sodio saturada, y luego se extrajo tres veces con diclorometano (10 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron a presión reducida y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (PE / EA = 5: 1) para dar el compuesto titulado (11 mg , rendimiento 22%).

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.45(d, 1H, J=3.6Hz), 8.38(s, 1H), 8.33(d, 1H, J=8.8Hz), 8.25(s, 1H), 7.97(s, 1H), 7.90(d, 1H, J=11.2Hz), 7.62(dd, 1H, J=8.8, 2.0Hz), 3.14-3.11(m, 2H), 2.55-2.46(m, 3H), 2.40(s, 3H), 2.18-2.03(m, 8H), 1.90-1.82(m, 6H), 1.15(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 503.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 13

5-Fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperidina-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



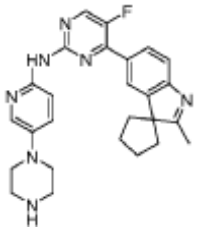
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 11.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.14(br s, 1H), 8.48(d, 1H, J=3.2Hz), 8.34-8.30(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.89(d, 1H, J=10.8Hz), 7.58(d, 1H, J=8.4Hz), 3.22-3.19(m, 2H), 2.76(t, 2H, J=11.6Hz), 2.66-2.60(m, 1H), 2.38(s, 3H), 2.16-2.02(m, 6H), 1.88-1.83(m, 4H), 1.69-1.61(m, 2H).

MS(ESI):m/z 475.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 14

5-fluoro-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



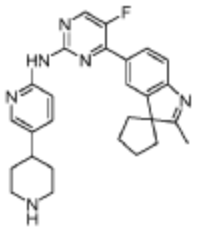
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 11.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.28(br s, 1H), 8.43(d, 1H, J=3.6Hz), 8.33(d, 1H, J=9.2Hz), 8.16-8.09(m, 3H), 7.63(d, 1H, J=8.0Hz), 7.32(dd, 1H, J=9.2Hz, 2.8Hz), 3.08-3.06(m, 4H), 3.03-3.02(m, 4H), 2.34(s, 3H), 2.29-2.04(m, 7H), 1.86-1.83(m, 2H).

MS(ESI):m/z 458.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 15

5-fluoro-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperidina-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



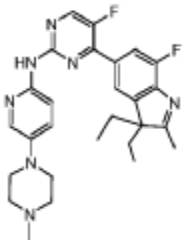
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 11.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.99(br s, 1H), 8.46(d, 1H, J=3.6Hz), 8.39(d, 1H, J=8.4Hz), 8.29(d, 1H, J=1.6Hz), 8.15-8.11(m, 2H), 7.65(d, 1H, J=8.0Hz), 7.58(dd, 1H, J=8.8Hz, 2.0Hz), 3.22-3.19(m, 2H), 2.76(t, 2H, J=10.4Hz), 2.65-2.59(m, 1H), 2.36(s, 3H), 2.18-2.05(m, 7H), 1.88-1.83(m, 4H), 1.70-1.60(m, 2H).

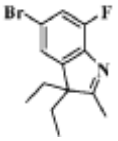
MS(ESI):m/z 457.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 16

4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



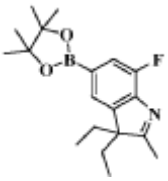
Paso 1: Preparación de 5-bromo-3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol



Se añadieron 10 ml de ácido acético, 5.0 g (20.75 mmol) de clorhidrato de (4-bromo-2-fluorofenil) hidracina y 2.35 g (20.75 mmol) de 3-etilpentan-2-ona a un matraz de reacción, y a la mezcla se le dejó reaccionar a reflujo durante 5 h. El producto de reacción se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el solvente, se le añadieron 50 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces (50 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 50 ml de solución salina, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron, se sometieron a evaporación rotatoria y se separaron por cromatografía en columna (EA: PE = 1: 100-1:10) para obtener el compuesto titulado (2.5 g, aceite amarillo), rendimiento 87.1%.

MS (ESI): m/z 286.1 $[M+H]^+$.

Paso 2: Preparación of 3,3-Dietil-7-fluoro-2-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2 -dioxaborolan-2-il)-3H-indol

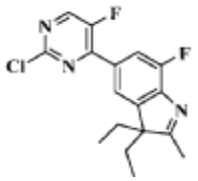


2.0 g (7.07 mol) de 5-bromo-3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol preparados en el Paso 1, 1,97 g (7.77 mmol) de 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bis (1,3,2-dioxaborolano), 1.38 g (1.41 mmol) de acetato de potasio, 10 ml de 1,4-dioxano y 1,03 g (1.41 mmo) de Pd(dppf)Cl_2 se añadieron al matraz de reacción, y la mezcla se calentó a 90 ºC bajo la protección de gas nitrógeno para llevar a cabo la reacción durante la noche. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se diluyó con 10 ml de agua y se extrajo tres veces con acetato de etilo (10 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 15 ml de solución salina, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (EA: PE = 1:50 a 1:10) para dar el compuesto titulado

(2.0 g, aceite amarillo), rendimiento 86.96%.

MS (ESI): m/z 332.3 $[M+H]^+$.

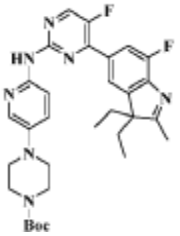
Paso 3: 5-(2-Cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol



Se cargó un matraz de reacción con 2.0 g (6.05 mmol) de 3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2- il) -3H-indol preparado en el Paso 2, 1,10 g (6.65 mmol) de 2,4-dicloro-5-fluoropirimidina, 2.56 g (12.1 mmol) de fosfato de potasio, 20 ml / 5 ml de dioxano / agua, 0.69 g (0.61 mmol) de $Pd(PPh_3)_4$, y la mezcla se calentó a 120 ºC bajo la protección de gas nitrógeno y se dejó reaccionar durante 2 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se diluyó con 10 ml de agua y se extrajo tres veces con 50 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 20 ml de solución salina, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron a presión reducida y se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (EA: PE = 1: 100-1:10) para dar el compuesto titulado (1.2 g, sólido amarillo), rendimiento 59,4%.

MS (ESI): m/z 336.1 $[M+H]^+$.

Paso 4: Preparación del éster t-butílico del ácido 4-(6-((4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il) -5-fluoropirimidin-2-il)amino)piridin-3-il)piperazina-1-carboxylico.



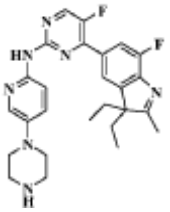
Se cargó un matraz de reacción con 400.0 mg (1.19 mmol) de 5- (2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il) -3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol preparado en el Paso 3, 331.9 mg (1.19 mmol) de 4-(6-aminopiridin-3-il) piperazin-1-carboxilato de t-butilo preparado de acuerdo con los Pasos 1 - 2 del Ejemplo 1, 776.2 mg (2.38 mmol) de carbonato de cesio, 10 ml de 1,4-dioxano, 109.5 mg (0.12 mmol) de $Pd_2(dba)_3$ y 69.0 mg (0.12 mmol) de 4,5-bis (difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno, y protegido por nitrógeno. A la mezcla se dejó llevar a cabo la reacción de microondas a 130 °C durante 1 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se diluyó con 10 ml de agua, se extrajo tres veces con 10 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron,

se lavaron una vez con 30 ml de solución salina, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron y se separaron por TLC para obtener el compuesto titulado (253.1 mg, sólido amarillo), rendimiento 36.74%.

MS (ESI): m/z 578.3 $[M+H]^+$.

Paso 5:

4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino

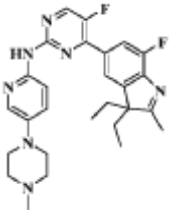


Se cargó un matraz de reacción con éster t-butílico del ácido 4-(6-((4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il) -5-fluoropirimidin-2-il)amino) piridin-3-il) piperazina-1-carboxílico 250.0 mg (0.43 mmol) preparado en el Paso 4, diclorometano 4 ml y TFA 1 ml. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, y el solvente se retiró. El residuo se ajustó a pH 8 con 5 ml de solución de bicarbonato sódico saturada y se extrajo tres veces con diclorometano (5 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 10 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron a presión reducida y se separaron por TLC para dar el compuesto titulado (201.2 mg, sólido amarillo), rendimiento 97.6%.

MS (ESI): m/z 478.3 $[M+H]^+$.

Paso 6:

4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



Se cargó un matraz de reacción con 50.0 mg (0.10 mmol) de 4- (3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il) -5-fluoro-N- (5- (piperazina)-1-il) piridin-2-il) pirimidina-2-amino, 30.8 mg (1.0 mmol) de formaldehído, 2 ml de 1-etil- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida, 65.3mg (0.3mmol) de trietilborohidruro de sodio, y la mezcla se dejó reaccionar durante la noche. Se añadieron 2 ml

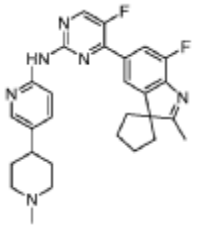
de metanol para apagar la reacción, y el producto de reacción se extrajo tres veces con diclorometano (5 ml por cada vez). La fase orgánica se lavó una vez con 10 ml de solución salina saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró y se separó por TLC para obtener el compuesto titulado (20,3 mg, sólido amarillo), rendimiento 39,4%....

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.57(br s, 1H), 8.47(d, 1H, J=3.2Hz), 8.28(d, 1H, J=8.8Hz), 8.18(d, 1H, J=2.0Hz), 7.91(d, 1H, J=11.2Hz), 7.78(s, 1H), 7.33(d, 1H, J=8.8Hz), 3.16-3.15(m, 4H), 2.58-2.57(m, 4H), 2.33(s, 3H), 2.26(s, 3H), 2.04-1.95(m, 2H), 1.85-1.78(m, 7H), 0.43(t, 6H, J=7.2Hz).

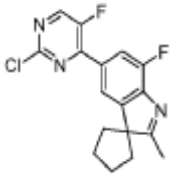
MS(ESI):m/z 492.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 17

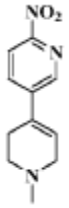
5-Fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



El intermedio 5'-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol] se obtuvo con los pasos similares a los del Ejemplo 1.



<u>Paso 1:</u> 1'-Metil-6-nitro-1',2',3',6'-tetrahidro-3,4'-bipiridina

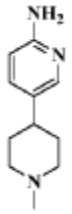


Se cargó un matraz de reacción con 5-bromo-2-nitropiridina (20.3 g, 0.1 mol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) -1,2,3,6-tetrahidropiridina (22.3 g, 0.1 mol), dioxano / agua (250 ml / 30 ml), carbonato de cesio (66 g, 0.2 mol) y $Pd(dppf)Cl_2$ (7.33 g, 0.01 mol). La mezcla se agitó para que reaccionara a 85 °C bajo la protección del gas nitrógeno durante 12 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró y se separó mediante

cromatografía en columna (PE / EA = 1: 1 a DCM / MeOH = 20: 1) para dar el producto titulado (5.7 g, sólido blanco).

MS (ESI): masa calculada para $C_{11}H_{13}N_3O_2$ 219.1, m/z encontrado 220.1 $[M+H]^+$.

Paso 2: 5-(1-Metilpiperidin-4-il) piridin-2-amino

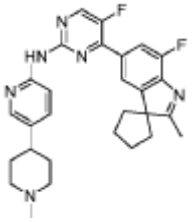


Se cargó un matraz de reacción con 1'-metil-6-nitro-1',2',3',6'-tetrahidro-3,4'-bipiridina (657 mg, 3.0 mmol) preparado en el Paso 1, acetato de etilo / metanol (10 ml / 10 ml) y Pd / C (0.1 g). Se introdujo gas hidrógeno en la mezcla, y la mezcla se agitó para que reaccionara durante 2 h, se filtró y se concentró para dar el producto titulado (550 mg, sólido blanco).

MS (ESI): masa calculada para $C_{11}H_{17}N_3$ 191.1, m/z encontrado 192.2 $[M+H]^+$.

Paso 3

5-Fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



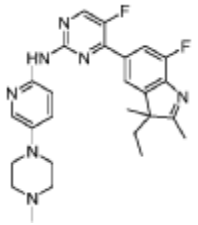
Se cargó un matraz de reacción con el intermedio 5'-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol] (150.0 mg, 0.45 mmol)), 5-(1-metilpiperidin-4-il) piridin-2-amino (86.6 mg, 0.45 mmol) preparado en el Paso 2, carbonato de cesio (293.2 mg, 0.9 mmol), dioxano (3 ml), $Pd_2(dba)_3$ (44.7 mg, 0.05 mmol), 4,5-bis (difenilfosfino) -9,9-dimetilxanteno (30.4 mg, 0.05 mmol). La mezcla se calentó a 150 °C bajo la protección de. gas nitrógeno para llevar a cabo la reacción de microondas durante 1 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se le agregaron 10 ml de agua y se extrajo tres veces con diclorometano (10 ml por cada vez). La fase orgánica combinada se lavó una vez con 30 ml de solución acuosa de cloruro de sodio saturada, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró y se separó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano / metanol = 50: 1) para dar el compuesto titulado (51.1 mg, sólido amarillo).

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.38(br s, 1H), 8.49(d, 1H, J=3.2Hz), 8.34-8.33(m, 2H), 7.96(s, 1H), 7.88(d, 1H, J=11.2Hz), 7.58(dd, 1H, J=8.8Hz, 1.6Hz), 3.01-2.98(m, 2H), 2.52-2.44(m, 1H), 2.38(s, 3H), 2.34(s, 3H), 2.25-2.04(m, 8H), 1.87-1.76(m, 6H).

MS(ESI):m/z 489.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 18

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-il) pirimidina-2-amino



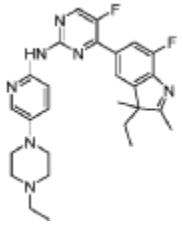
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 16.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.48(br s, 1H), 8.47(d, 1H, J=3.2Hz), 8.28(d, 1H, J=9.2Hz), 8.17(s, 1H), 7.90(d, 1H, J=10.8Hz), 7.82(s, 1H), 7.34(d, 1H, J=8.4Hz), 3.17-3.16(m, 4H), 2.59-2.58(m, 4H), 2.35(s, 3H), 2.31(s, 3H), 2.01-1.96(m, 1H), 1.87-1.82(m, 1H), 1.35(s, 3H), 0.47(t, 3H, J=7.2Hz).

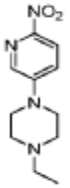
MS(ESI):m/z 478.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 19

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-N-(5-(4-etilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-5-fluoropyrimidine-2-amino



<u>Paso 1:</u> Preparación de 1-etil-4-(6-nitropiridin-3-il) piperazina

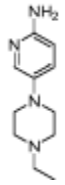


4.00 g (19.7 mmol) de 5-bromo-2-nitropiridina, 3.40 g (2.98 mmol) de 1-etilpiperazina, 4.10 g (29.6 mmol) de carbonato de potasio, 0.4 g (1.2 mmol) de yoduro de tetrabutilamonio y 40 mL

de DMSO se añadieron a un matraz de reacción y se hicieron reaccionar a 80 °C durante 16 h. La solución de reacción se vertió luego en agua helada y se extrajo tres veces con diclorometano (20 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron y se separaron por cromatografía en columna (DCM / MeOH = 100: 1-10: 1) para dar 3.59 g de un sólido amarillo, rendimiento 56.1%

MS (ESI): m/z 237.2 $[M+H]^+$.

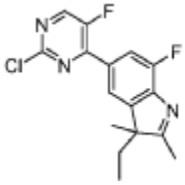
Paso 2: Preparación of 5-(4-etilpiperazin-1-il)piridin-2-amino



650 mg (2.13 mmol) de 1-etil-4- (6-nitropiridin-3-il) piperazina preparados en el Paso 1 se disolvieron en 45 ml de metanol, se añadió paladio carbono al 10% (250 mg, cat), la atmósfera se reemplazó tres veces con gas hidrógeno, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 12 h en la atmósfera de gas hidrógeno bajo 3 atmósferas. Después de detener la reacción, el producto de reacción se filtró con una pequeña cantidad de diatomita, y la torta filtrante se lavó una vez con 20 ml de un solvente mixto de diclorometano y metanol (V / V = 10: 1). A continuación, el filtrado se recogió y se concentró a presión reducida para producir 559 mg de producto bruto del compuesto titulado (material transparente y viscoso) el cual se usó en la reacción posterior directamente sin purificación adicional.

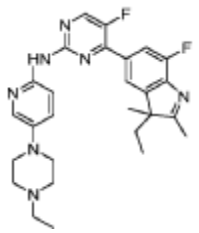
MS (ESI): m/z 207.1 $[M+H]^+$.

Paso 3: Preparación de 5-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil -3H-indol



Este intermedio se preparó por el mismo método que los Pasos 1 - 3 del Ejemplo 16.

Paso 4: Preparación de 4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-N-(5- (4-etilpiperazin-1-il)piridin -2-il)-5-fluoropirimidina-2-amino



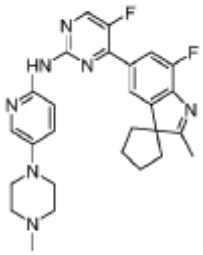
Se cargó un matraz de reacción con 321 mg (1 mmol) de 5-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il) -3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol preparado en el Paso 3, 206 mg (1 mmol) de 5-(4-etilpiperazin-1-il) piridin-2-amino obtenido en el Paso 2, 2 ml de 1,4-dioxano, 650 mg (2 mmol) de Cs_2CO_3, 91 mg (0.1 mmol) de $Pd_2(dba)_3$ y 58 mg (0.1 mmol) de difenilfosfina. La mezcla se calentó a 120 °C para llevar a cabo la reacción de microondas durante 1 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se le añadieron 10 ml de agua y luego se extrajo con acetato de etilo tres veces (40 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 40 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato sódico, se filtraron, se concentraron a presión reducida y se separaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM / MeOH = 10: 1) para dar el compuesto titulado (49 mg, sólido amarillo), rendimiento 10%.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.25(br s, 1H), 8.46(d, 1H, J=3.2Hz), 8.28(d, 1H, J=9.2Hz), 8.17(d, 1H, J=2.0Hz), 7.90(d, 1H, J=11.2Hz), 7.82(s, 1H), 7.35(dd, 1H, J=9.2Hz, 2.8Hz), 3.20-3.18(m, 4H), 2.64-2.61(m, 4H), 2.51(q, 2H, J=6.8Hz), 2.31(s, 3H), 2.03-1.94(m, 1H), 1.89-1.82(m, 1H), 1.36(s, 3H), 1.13(t, 3H, J=7.2Hz), 0.48(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 492.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 20

5-Fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



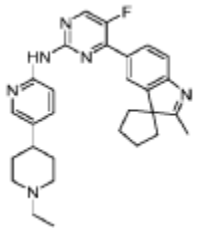
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 16.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ9.77(br s, 1H), 8.63(d, 1H, J=4.0Hz), 8.02-7.98(m, 3H), 7.82(d, 1H, J=11.2Hz), 7.41(dd, 1H, J=8.8Hz, 2.8Hz), 3.13-3.11(m, 4H), 2.49-2.46(m, 4H), 2.33(s, 3H), 2.26(s, 3H), 2.23-2.07(m, 6H), 1.76-1.74(m, 2H).

MS(ESI):m/z 490.3[M+H]$^+$.

Ejemplo 21

N-(5-(1-etilpiperidin-4-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



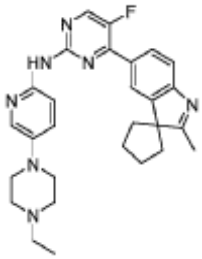
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 12.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ9.91(br s, 1H), 8.65(d, 1H, J=4.0Hz), 8.28-8.14(m, 3H), 8.04(d, 1H, J=8.4Hz), 7.43(dd, 1H, J=8.4Hz, 2.0Hz), 7.60(d, 1H, J=8.0Hz), 3.00-2.97(m, 4H), 2.38-2.33(m, 2H), 2.30(s, 3H), 2.08-2.07(m, 6H), 1.99-1.94(m, 2H), 1.77-1.64(m, 6H), 1.02(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 485.3[M+H]$^+$.

Ejemplo 22

N-(5-(4-etilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



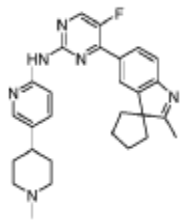
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 19.

^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$) δ8.87(br s, 1H), 8.42(d, 1H, J=3.6Hz), 8.33(d, 1H, J=9.2Hz), 8.13-8.10(m, 3H), 7.65(d, 1H, J=8.0Hz), 7.35(dd, 1H, J=8.8Hz, 2.4Hz), 3.19-3.18(m, 4H), 2.64-2.63(m, 4H), 2.53(q, 2H, J=6.8Hz), 2.35(s, 3H), 2.27-2.06(m, 6H), 1.88-1.85(m, 2H), 1.14(t, 3H, J=6.8Hz).

MS(ESI):m/z 486.4[M+H]$^+$.

Ejemplo 23

N-(5-(4-metilpiperidin-1-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



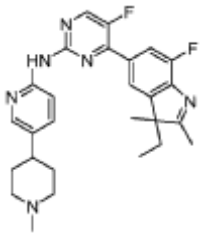
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 17.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.24(br s, 1H), 8.47(d, 1H, J=3.2Hz), 8.38(d, 1H, J=8.8Hz), 8.31(s, 1H), 8.14-8.09(m, 2H), 7.64(d, 1H, J=8.4Hz), 7.57(dd, 1H, J=8.4Hz, 2.4Hz), 3.00-2.98(m, 2H), 2.49-2.46(m, 1H), 2.35(s, 3H), 2.33(s, 3H), 2.16-1.99(m, 8H), 1.85-1.76(m, 6H).

MS(ESI):m/z 471.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 24

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



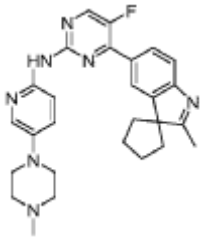
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 17.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.74(br s, 1H), 8.50(d, 1H, J=3.6Hz), 8.35-8.32(m, 2H), 7.88-7.82(m, 2H), 7.57(d, 1H, J=8.8Hz), 2.97-2.95(m, 2H), 2.49-2.42(m, 1H), 2.30(s, 6H), 2.24-1.93(m, 3H), 1.88-1.74(m, 5H), 1.35(s, 3H), 0.47(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 477.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 25

5-Fluoro-N-(5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-4-(2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il) pirimidina-2-amino



El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 16.

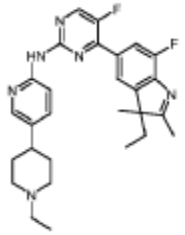
^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.28(br s, 1H), 8.44(d, 1H, J=3.6Hz), 8.33(d, 1H, J=9.2Hz),

8.18(d, 1H, J=2.0Hz), 8.12-8.09(m, 2H), 7.64(d, 1H, J=8.0Hz), 7.33(dd, 1H, J=9.2Hz, 2.4Hz), 3.16-3.14(m, 4H), 2.59-2.58(m, 4H), 2.35(s, 3H), 2.34(s, 3H), 2.15-2.06(m, 6H), 1.87-1.83(m, 2H).

MS(ESI):m/z 472.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 26

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-N-(5-(1-etilpiperidin-4-il)piridin-2-il) -5-fluoropirimidina-2-amino



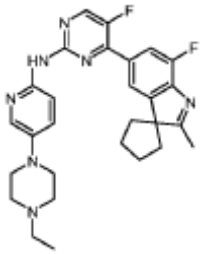
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 12.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ9.99(br s, 1H), 8.70(d, 1H, J=3.2Hz), 8.19(s, 1H), 8.14(d, 1H, J=8.8Hz), 7.92(s, 1H), 7.85(d, 1H, J=11.2Hz), 7.69(d, 1H, J=8.4Hz), 3.04-3.02(m, 2H), 2.42-2.41(m, 2H), 2.28(s, 3H), 2.04-1.99(m, 3H), 1.89-1.84(m, 1H), 1.78-1.63(m, 4H), 1.33(s, 3H), 1.04(t, 3H, J=6.8Hz), 0.36(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 491.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 27

N-(5-(4-etilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



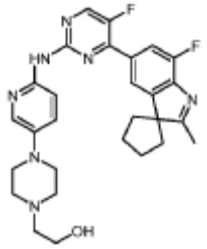
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 19.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.92(br s, 1H), 8.44(d, 1H, J=3.6Hz), 8.29(d, 1H, J=9.2Hz), 8.15(d, 1H, J=2.8Hz), 7.94(s, 1H), 7.89(d, 1H, J=11.2Hz), 7.36(dd, 1H, J=9.2Hz, 2.8Hz), 3.21-3.19(m, 4H), 2.65-2.63(m, 4H), 2.51(q, 2H, J=7.2Hz), 2.38(s, 3H), 2.22-2.07(m, 6H), 1.89-1.86(m, 2H), 1.15(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 504.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 28

2-(4-(6-((5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pyrimidin-2-il)amino)piridin-3-il)piperazin-1-il)ethanol



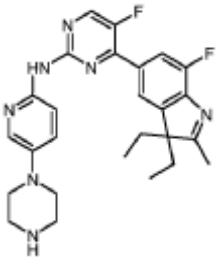
Se cargó un matraz de reacción con 5-fluoro-4- (7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il) pirimidina-2-amino 20 mg (0.04 mmol, preparado por el mismo método que en el Ejemplo 6), 16 mg (0.12 mmol) de 2-bromoetanol, 2 ml de DMF y 17 mg (0.12 mmol)) de carbonato de cesio. La mezcla se calentó a 80ºC y se hizo reaccionar durante 1 h, y luego el producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se le añadieron 10 ml de agua y se extrajo tres veces con acetato de etilo (40 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 40 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron a presión reducida y se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM / MeOH = 10: 1) para producir el compuesto titulado (10 mg, sólido amarillo), rendimiento 55%.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.52(br s, 1H), 8.43(d, 1H, J=2.8Hz), 8.29(d, 1H, J=9.2Hz), 8.09(s, 1H), 7.94(s, 1H), 7.89(d, 1H, J=10.8Hz), 7.36(d, 1H, J=8.8Hz), 3.70-3.68(m, 2H), 3.19-3.18(m, 4H), 2.71-2.63(m, 7H), 2.39(s, 3H), 2.25-2.00(m, 6H), 1.90-1.87(m, 2H).

MS(ESI):m/z 520.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 29

4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperazin-4-il)piridin-2-il) pirimidina-2-amino



El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 1.

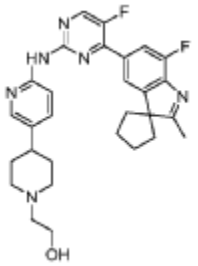
^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.66(br s, 1H), 8.45(d, 1H, J=3.6Hz), 8.29(d, 1H, J=9.2Hz),

8.11(d, 1H, J=2.8Hz), 7.94(d, 1H, J=11.2Hz), 7.81(s, 1H), 7.37(dd, 1H, J=8.8Hz, 2.4Hz), 3.13-3.12(m, 4H), 3.08-3.07(m, 4H), 2.30(s, 3H), 2.08-1.99(m, 2H), 1.91-1.82(m, 3H), 0.46(t, 6H, J=7.6Hz).

MS(ESI):m/z 478.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 30

2-(4-(6-((5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pyrimidin-2-il)amino)piridin-3-il)piperidina-1-il)etanol



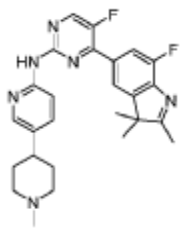
Se cargó un matraz de reacción con 20 mg (0.04 mmol) de 5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5- (piperidina-4-il) piridin-2-il) pirimidina-2-amino preparado por los mismos métodos que en el Ejemplo 13, 16 mg (0.12 mmol) de 2-bromoetanol, 2 ml de DMF y 17 mg (0.12 mmol) de carbonato de cesio, y la mezcla se calentó a 80 °C y se hizo reaccionar durante 1 h. A continuación, el producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se le agregaron 10 ml de agua y se extrajo tres veces con acetato de etilo (40 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 40 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida y se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (DCM / MeOH = 10: 1) para dar el compuesto titulado (10 mg, sólido amarillo), rendimiento 55%.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.63(br s, 1H), 8.46(d, 1H, J=3.2Hz), 8.34(d, 1H, J=8.4Hz), 8.26(s, 1H), 7.96(s, 1H), 7.90(d, 1H, J=10.8Hz), 7.60(d, 1H, J=8.0Hz), 3.67-3.66(m, 2H), 3.08-3.06(m, 2H), 2.60-2.52(m, 4H), 2.39(s, 3H), 2.25-2.11(m, 8H), 1.89-1.83(m, 4H), 1.80-1.77(m, 2H).

MS(ESI):m/z 519.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 31

5-Fluoro-4-(7-fluoro-2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il)-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



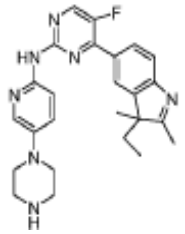
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 17.

^{1}H-NMR(400MHz, Methanol-d_4) δ8.57(br s, 1H), 8.37(d, 1H, J=3.6Hz), 8.18(s, 1H), 8.13(d, 1H, J=8.8Hz), 7.84(s, 1H), 7.70(d, 1H, J=11.2Hz), 7.51(d, 1H, J=7.2Hz), 3.21-3.18(m, 2H), 2.60-2.54(m, 4H), 2.50-2.44(m, 2H), 2.37(s, 3H), 1.90-1.79(m, 4H), 1.38(s, 6H).

MS(ESI):m/z 463.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 32

4-(3-etil-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



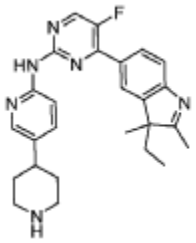
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 6.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.68(br s, 1H), 8.44(d, 1H, J=3.6Hz), 8.32(d, 1H, J=8.8Hz), 8.18(d, 1H, J=2.4Hz), 8.11(d, 1H, J=8.0Hz), 7.98(s, 1H), 7.64(d, 1H, J=8.0Hz), 7.30(d, 1H, J=2.8Hz), 3.05-3.04(m, 4H), 3.00-2.98(m, 4H), 2.26(s, 3H), 2.00-1.90(m, 2H), 1.83-1.74(m, 1H), 1.32(s, 3H), 0.45(t, 1H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 446.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 33

4-(3-etil-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(piperidina-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



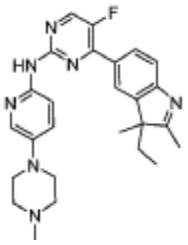
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 13.

^{1}H-NMR(400MHz, Methanol-d_4) δ8.33(d, 1H, J=2.8Hz), 8.16-8.13(m, 2H), 7.95-7.93(m, 2H), 7.48-7.41(m, 2H), 3.18-3.15(m, 2H), 2.73(t, 1H, J=11.6Hz), 2.59-2.53(m, 1H), 2.30(s, 3H), 2.01-1.96(m, 1H), 1.89-1.83(m, 1H), 1.79-1.76(m, 2H), 1.66-1.58(m, 2H), 1.32(s, 3H), 0.42(t, 1H, J=6.8Hz).

MS(ESI):m/z 445.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 34

4-(3-etil-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



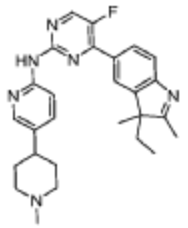
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 16.

^{1}H-NMR(400MHz, Methanol-d_4) δ8.42(d, 1H, J=3.2Hz), 8.18(d, 1H, J=8.8Hz), 8.09-8.01(m, 3H), 7.57(d, 1H, J=8.0Hz), 7.42-7.37(m, 1H), 3.22-3.15(m, 4H), 2.61-2.60(m, 4H), 2.35(s, 3H), 2.32(s, 3H), 2.07-2.02(m, 1H), 1.94-1.89(m, 1H), 1.38(s, 3H), 0.43(t, 1H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 460.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 35

4-(3-etil-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



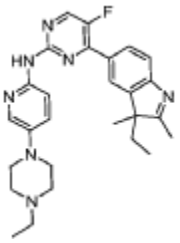
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 17.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.97(br s, 1H), 8.47(d, 1H, J=3.6Hz), 8.39(d, 1H, J=8.4Hz), 8.30(d, 1H, J=2.0Hz), 8.15(d, 1H, J=8.4Hz), 8.04(s, 1H), 7.68(d, 1H, J=8.0Hz), 7.59(dd, 1H, J=8.8Hz, 2.4Hz), 3.01-2.98(m, 4H), 2.51-2.45(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.31(s, 3H), 2.10-1.97(m, 3H), 1.85-1.81(m, 5H), 1.37(s, 3H), 0.49(t, 1H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 459.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 36

4-(3-etil-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-N-(5-(4-etilpiperazin-1-il)piridin-2-il)-5-fluoropirimidina-2-amino



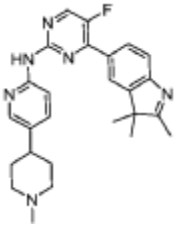
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 19.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ8.93(br s, 1H), 8.44(d, 1H, J=3.6Hz), 8.33(d, 1H, J=9.2Hz), 8.15-8.13(m, 2H), 8.02(s, 1H), 7.67(d, 1H, J=8.0Hz), 7.35(d, 1H, J=8.0Hz), 3.19-3.18(m, 4H), 2.63-2.62(m, 4H), 2.52-2.47(m, 2H), 2.30(s, 3H), 2.02-1.97(m, 1H), 1.86-1.80(m, 1H), 1.36(s, 3H), 1.14(t, 3H, J=7.2Hz), 0.57(t, 1H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 474.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 37

5-Fluoro-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)-4-(2,3,3-trimetil-3H-indol-5-il)pirimidina-2-amino



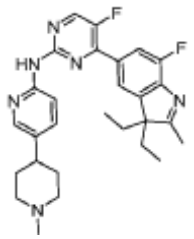
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 17.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ9.03(br s, 1H), 8.46(d, 1H, J=3.2Hz), 8.38(d, 1H, J=8.4Hz), 8.29(s, 1H), 7.67(d, 1H, J=8.0Hz), 7.60(dd, 1H, J=8.8Hz, 1.6Hz), 3.00-2.97(m, 2H), 2.49-2.44(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.33(s, 3H), 2.10-2.03(m, 2H), 1.84-1.79(m, 4H), 1.37(s, 6H).

MS(ESI):m/z 445.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 38

4-(3,3-dietil-7-fluoro-2-metil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



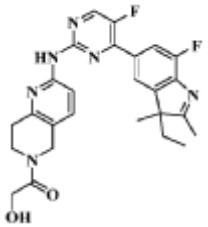
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 17.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ9.95(s, 1H), 8.69(s, 1H), 8.19-8.11(m, 2H), 7.89-7.84(m, 2H), 7.67(d, 1H, J=7.6Hz), 2.87-2.85(m, 2H), 2.25(s, 3H), 2.19(s, 3H), 2.02-1.92(m, 6H), 1.90-1.65(m, 4H), 0.34(m, 6H).

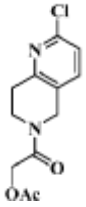
MS(ESI):m/z 491.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 39

1-(2-((4-(3-Etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoropirimidin-2-il)amino)-7,8-dihidro-1,6-naftiridina-6 (5H)-il)-2-hidroxiacetamida



<u>Paso 1:</u> 2-(2-Cloro-7,8-dihidro-1,6-naftiridina-6 (5H)-il)-2-acetoxiacetamida

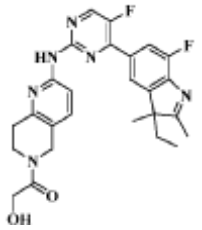


Un matraz de reacción se cargó con 1.0 g (5.95 mmol) de 2-cloro-5,6,7,8-tetrahidro-1,6-naftiridina, 1.21 g (11.90 mmol) de trietilamina y 5 ml de diclorometano, y luego se añadió lentamente gota a gota cloruro de 2-cloro-2-acetoxiacetilo (1.22 g, 8.93 mmol). La mezcla se dejó reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente, y la reacción se apagó con 5 ml de agua. El solvente se eliminó y el residuo se extrajo tres veces con diclorometano (15 ml cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 10 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el producto bruto del compuesto titulado (1.09 g, blanquecino), rendimiento 68.21%.

MS (ESI): m/z 269.1 $[M+H]^+$.

Paso 2:

1-(2-((4-(3-Etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoropirimidin-2-il)amino)-7,8-dihidro-1,6-naftiridina-6(5H)-il)-2-hidroxiacetamida



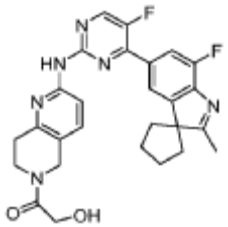
Se cargó un matraz de reacción con 101 mg (0.34 mmol) de 4- (3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il) -5-fluoropirimidina-2-amino preparado por el método similar a los pasos 1 - 3 del Ejemplo 1, 85.2 mg (0.32 mmol) de 2-(2-cloro-7,8-dihidro-1,6-naftiridina-6(5H)-il)-2-acetoxiacetamida, 10 mL de dioxano, 65.3 mg (0.68 mmol) de terc-butóxido de sodio, 31.2 mg (0.034 mmol) de $Pd_2(dba)_3$, 19.7 mg (0.034 mmol) de 4,5-bis (difenilfosfino) -9,9-dimetilxanteno. La mezcla se calentó a 120 ºC y se dejó conducir la reacción con microondas durante 1 h, y luego el producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se le agregaron 50 ml de agua y se extrajo tres veces con acetato de etilo (50 ml por cada vez). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 50 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron, se concentraron y se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano / metanol = 10: 1) para dar el compuesto titulado (20 mg, sólido blanco), rendimiento 12%.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ9.98(s, 1H), 8.70(d, 1H, J=3.6Hz), 8.07(d, 1H, J=8.4Hz), 7.94(s, 1H), 7.87(d, 1H, J=11.2Hz), 7.64-7.57(m, 1H), 4.68-4.55(m, 3H), 4.22-4.21(m, 2H), 4.21-4.19(m, 2H), 2.89-2.81(m, 2H), 2.28(s, 3H), 2.04-1.84(m, 2H), 1.33(s, 3H), 0.37(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 493.2$[M+H]^+$.

Ejemplo 40

1-(2-((5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3’-indol]-5’-il)pirimidin-2-il)amino)-7,8-dihidro-1,6-naftiridina-6 (5H)-il) -2-hidroxiacetamide



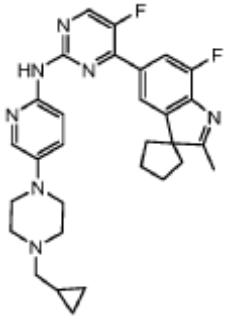
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 39.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ10.07(brs, 1H), 8.69(d, 1H, J=3.6Hz), 8.53(s, 1H), 8.09-8.02(m, 1H), 7.98(s, 1H), 7.88(d, 1H, J=12.4Hz), 7.62-7.54(m, 1H), 4.73(brs, 1H), 4.62-4.61(m, 2H), 4.21-4.19(m, 2H), 2.89-2.81(m, 2H), 2.50(s, 2H), 2.34-2.11(m, 5H), 1.75-1.72(m, 2H).

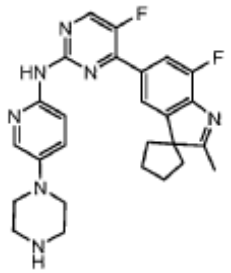
MS(ESI):m/z 505.2$[M+H]^+$.

Ejemplo 41

N-(5-(4-(ciclopropilmetil)piperazin-1-il)piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



El intermedio 5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il)pirimidina-2-amino se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 6.



El intermedio anterior 5-fluoro-4- (7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol] -5'-il) -N-(5-(piperazin-1-il)piridin-2-il) pirimidina-2-amino (150 mg, 0.32 mmol), bromometil ciclopropano, acetonitrilo (5 ml), y carbonato de potasio (130.0 mg, 0.96 mmol) se añadieron a un matraz de reacción, y se calentaron a 80 °C y se hicieron reaccionar durante 4 h. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se le agregaron 50 ml de agua, se extrajo tres veces con 10 ml de diclorometano (10 ml por cada vez). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 15 mg de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se separaron por cromatografía en columna (diclorometano / metanol = 10: 1) para obtener el producto titulado de este ejemplo (42.1 mg, sólido blanco).

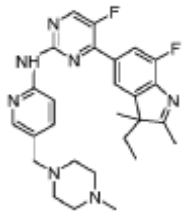
^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ9.89(s, 1H), 8.68(m, 1H), 8.64-8.01(m, 3H), 7.87(d, 1H, J=14.4Hz), 7.42-7.40(m, 1H), 3.14-3.13(m, 5H), 2.60-2.51(m, 5H), 2.33(s, 3H), 2.24-2.23(m,

2H), 2.09-2.02(m, 6H), 1.99-1.97(m, 2H), 1.75-1.74(m, 2H), 0.85-0.83(m, 2H), 0.48-0.47(m, 2H).

MS(ESI):m/z 530.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 42

4-(3-etil-7-fluoro-2,3-dimetil-3H-indol-5-il)-5-fluoro-N-(5-((4-metilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il)pirimidina-2-amino



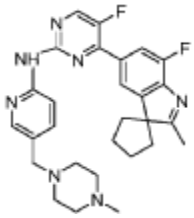
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ10.06(brs, 1H), 8.72(d, 1H, J=3.2Hz), 8.18-8.15(m, 2H), 7.93(s, 1H), 7.86(d, 1H, J=11.6Hz), 7.67(d, 1H, J=5.2Hz), 3.42(s, 2H), 2.35-2.28(m, 8H), 2.14(s, 3H), 2.04-1.98(m, 1H), 1.89-1.84(m, 1H), 1.34(s, 3H), 0.36(t, 3H, J=7.2Hz).

MS(ESI):m/z 492.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 43

5-Fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)-N-(5-((4-metilpiperazin-1-il)metil)piridin-2-il) pirimidina-2-amino



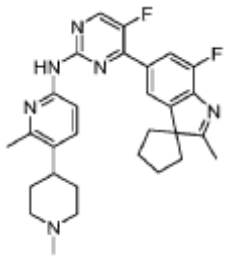
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 2.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ10.09(s, 1H), 8.71(d, 1H, J=3.2Hz), 8.18-8.15(m, 2H), 8.02(s, 1H), 7.85(d, 1H, J=11.2Hz), 7.67(d, 1H, J=8.4Hz), 3.43(s, 2H), 2.50-2.34(m, 8H), 2.14(s, 3H), 2.14-2.08(m, 6H), 1.75-1.74(m, 2H), 1.75-1.72(m, 2H).

MS(ESI):m/z 504.2$[M+H]^+$.

Ejemplo 44

N-(5-(1-metilpiperidin-4-il)-(6-metilpiridin)-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



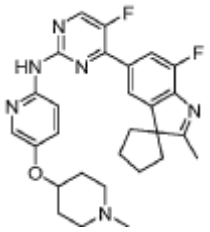
El compuesto titulado se obtuvo mediante los pasos similares a los del Ejemplo 12.

^{1}HNMR(400MHz, DMSO-d_6), δ9.84(s, 1H), 8.70(s, 1H), 8.11(s, 1H), 7.98-8.01(d, 2H), 7.81-7.85(d, 1H), 2.87-2.90(d, 2H), 2.50-2.51(m, 1H), 2.20-2.34(m, 6H), 1.78-1.98(m, 8H), 1.69-1.75(m, 6H).

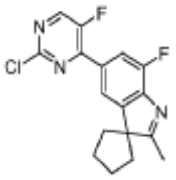
MS(ESI):m/z 503.3$[M+H]^+$.

Ejemplo 45

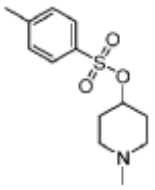
N-(5-((1-metilpiperidin-4-il)oxy)-piridin-2-il)-5-fluoro-4-(7'-fluoro-2'-metilspiro[ciclopentano-1,3'-indol]-5'-il)pirimidina-2-amino



El intermedio 5'-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-il)-7'-fluoro-2'-metilspiro [ciclopentano-1,3'-indol] se preparó mediante los pasos similares a los del Ejemplo 1.



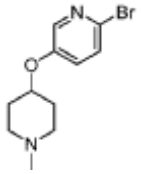
<u>Paso 1:</u> 1-Metilpiperidin-4-il 4-metilbenzeno sulfonato



Se añadieron 4-Hidroxi-1-metilpiperidina (1000 mg, 8.69 mmol), cloruro de p-toluenosulfonilo (3310 mg, 17.38 mmol), diclorometano (50 ml) y trietilamina (1 ml) a un matraz de reacción, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h. Luego, al producto de reacción se le agregaron 50 ml de agua y se extrajo tres veces con 30 ml de diclorometano (30 ml

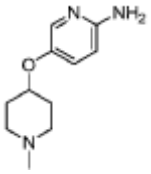
por cada vez). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 50 mg de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se separaron por cromatografía en columna (diclorometano / metanol = 50: 1) para producir 1.87 g de compuesto intermedio, rendimiento 80.0% (sólido amarillo pálido).

Paso 2: 2-bromo-5 -((1-metilpiperidin-4-il) oxi) piridina



Se añadieron el compuesto intermedio 1-metilpiperidin-4-il 4-metilbencenosulfonato (1000 mg, 3.70 mmol), 2-bromo-5-hidroxipiridina (637 mg, 3.70 mmol) y DMF (50 ml) a un matraz de reacción, y la mezcla se calentó a 90 °C y se hizo reaccionar durante 2 h. Al producto de reacción se le agregaron 50 ml de agua y se extrajo tres veces con diclorometano (30 ml por cada vez). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con 50 mg de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se separaron por cromatografía en columna (diclorometano / metanol = 40: 1) para dar 0.49 g del compuesto intermedio (sólido amarillo pálido) rendimiento de 50.1%.

Paso 3: 5 -((1-metilpiperidin-4-il) oxi)-piridin-2-amino



Se cargó un matraz de reacción con el compuesto intermedio 2-bromo-5 - ((1-metilpiperidin-4-il) oxi) piridina (1000 mg, 3.70 mmol), sodio bis (trimetilsilil) amida (618 mg, 3.70 mmol), tetrahidrofurano (50 ml), 2- (diciclohexilfosfino) bifenilo (120 mg, 0.37 mmol) y tris (dibencilidendiindeneacetona) dipaladio (338 mg, 0.37 mmol), y la mezcla se calentó a 65 ºC y se hizo reaccionar durante 12 h. Al producto de reacción se le agregaron 50 ml de agua, se extrajo tres veces con diclorometano (30 ml por cada vez). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con 50 ml de solución salina saturada, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se separaron por cromatografía en columna (diclorometano / metanol = 10: 1) para dar el compuesto intermedio (0.37 g, sólido amarillo), rendimiento 49.3%.

Paso 4：

N-(5-((1-metilpiperidin-4-il)oxi) -piridin-2-il)-5- fluoro-4- (7'-fluoro-2'-metilspiro

[ciclopentano -1,3'-indole] -5'-il) pirimidina-2-amino se preparó mediante el método similar al Paso 6 del Ejemplo 1.

^{1}HNMR(400MHz, DMSO-d_6), δ9.69(s, 1H), 8.63(s, 1H), 7.93-7.99(d, 1H), 7.80-7.83(d, 1H), 7.81-7.85(d, 1H), 7.12-7.14(d, 1H), 5.76-5.82(m, 1H), 5.02-5.13(m, 2H), 3.79(s, 2H), 2.56-2.59(m, 13H), 2.28-2.33(m, 6H), 1.74-1.99(m, 2H).

MS(ESI):m/z 505.2$[M+H]^+$.

El control usado en los siguientes ejemplos experimentales con el No. LY2835219 se preparó de acuerdo con el método de preparación del documento WO2010075074, y su fórmula estructural es la que se muestra en la fórmula estructural 3 en los antecedentes de la técnica.

Ejemplo Experimental 1

Medición de la actividad inhibidora quinasa CDK de los compuestos de la presente invención. El efecto inhibidor *in vitro* de los compuestos de la presente invención sobre la actividad quinasa CDK (CDK1, CDK4 y CDK6) se ensayó por medio del siguiente método.

1.1 Información de instrumentos y del kit

Nombre	Tipo	Fabricante
Sacudidor de placas	MTS2/4	IKA
Lector de micro placas	M1000pro	TECAN
Centrifuga	Avanti J-26XP	Beckman Coulter
Ensayo de Quinasa ADP-Glo™ + Sistema de enzimas quinasas CDK1/CiclinaA2	V9211	Promega
Ensayo de Quinasa ADP-Glo™ + Sistema de enzimas quinasas CDK4/CiclinaE1	V4489	Promega
Ensayo de Quinasa ADP-Glo™ + Sistema de enzimas quinasas CDK6/CiclinaD3	V4511	Promega
Ensayo de Quinasa ADP-Glo™ + Sistema de enzimas quinasas CDK9/CiclinaK	V4105	Promega
Tampón de Reacción A 5×	V307A-C	Promega

1.2 Preparación Experimental

1.2.1 Preparación del tampón de reacción de quinasa I: El tampón de reacción A 5× (Promega; V307A-C) provisto en el kit se mezcló y se diluyó con Milli Q H_2O y 0.1 M DTT (ditiotreitol) para producir el tampón de quinasa 4× y luego se añadió adicionalmente Milli Q H_2O

para finalmente formular la solución en el tampón de quinasa 1×.

Preparación del tampón de reacción de quinasa II: Se añadió 0.5% DMSO (sulfóxido de dimetilo) al tampón de reacción de quinasa 1× y se mezcló bien.

1.2.2 Preparación de la solución de quinasa: Se prepararon soluciones de quinasa que tienen las concentraciones requeridas para cada sistema de reacción a partir de 100 ng / μl de solución madre de quinasa y del tampón de reacción de quinasa 1×.

1.2.3 Preparación de la solución de compuesto de prueba y solución de control LY2835219:

(1) Preparación de la solución de control LY2835219

a. Se tomó 1 μl of 10mM de solución madre de sustancia estándar y se añadió a 9 μl de tampón de reacción de quinasa I y se mezcló bien; luego se añadieron 90 μl de tampón de reacción de quinasa I y se mezcló bien; luego se añadieron 100 μl de tampón de reacción de quinasa I y se mezcló bien. La concentración final fue 50 μM.

b. Se añadieron 40 μl de tampón de reacción de quinasa II a B2 a B10 de una placa de 96 pocillos, y 50 μl de la solución anterior se agregaron en B1;

c. 10μl de solución se tomaron del pocillo B1, se agregaron a B2, y se mezcló bien; luego se tomaron 10μl de la solución resultante y se agregaron a B3, y la dilución se llevó a cabo en secuencia hasta B9, de tal forma que se obtuvieron soluciones de control que están diluidas secuencialmente por 5 veces.

(2) Preparación de la solución del compuesto de prueba:

a. Se tomaron soluciones de compuestos de prueba a una cierta concentración, respectivamente, se diluyeron con tampón de reacción de quinasa I hasta una concentración final de 50 μM de solución de compuesto;

b. Se añadieron 40 μl de tampón de reacción de quinasa II a H2 hasta H10 de la placa de 96 pocillos; y 50 μl de la solución anterior se añadieron a H1;

c. Se tomaron 10 μl de solución del pozo H1, se añadieron a H2 y se mezcló bien; luego se tomaron 10 μl de la solución resultante y se añadieron a H3, y la dilución se llevó a cabo en secuencia hasta H9, de manera que se obtuvieron soluciones de compuestos de prueba que están diluidas secuencialmente por 5 veces.

1.2.4 Preparación de una solución mixta de sustrato de reacción y ATP:

a. Preparación de la solución de ATP:

200 μl de solución de ATP 0.1 mM: se añadieron 2 μl de ATP de 10 mM a 198 μl de tampón de reacción de quinasa I;

300 µl de solución de ATP de 50 µM: se añadieron 150 µl de tampón de reacción de quinasa I a 150 µl de la solución de ATP de 0.1 mM anterior;

b. Preparación de 300 µl de solución de sustrato de reacción:

Se añadieron 150 µl de solución madre de sustrato de reacción de 1 µg / µl a 150 µl de tampón de reacción de quinasa I, y se mezcló bien;

c. Las soluciones a / b anteriores se mezclaron para obtener soluciones mixtas, respectivamente.

1.3 Proceso experimental:

1.3.1: Se tomaron 2 µl de soluciones de compuesto de diversas concentraciones, se añadieron a una placa de 384 pocillos y se centrifugaron 3 minutos;

1.3.2: Se añadieron 4 µl de solución de quinasa a cada pocillo, se centrifugó a 5000 rpm y a 18 ºC durante 10 minutos, y se sacudió en un agitador de placas durante 10 minutos;

1.3.3: Se añadieron 4 µl de solución mixta de sustrato y ATP a cada pocillo, se centrifugaron a 5000 rpm y 18 ºC durante 10 minutos, y se sacudieron en un agitador de placas a 37 ºC durante 90 minutos;

1.3.4: La placa de 384 pocillos se sacó y se dejó reposar a temperatura ambiente;

1.3.5: Se añadieron 10 µl de reactivo ADP-Glo a cada pocillo, se centrifugó a 5000 rpm y 18 ºC durante 18 minutos, y se agitó en un agitador de placas a 25 ºC durante 40 minutos, y luego la reacción fue detenida;

1.3.6: Se añadieron 20 µl de reactivo de detección de quinasa a cada pocillo, se centrifugó a 5000 rpm y 18 ºC durante 10 minutos, y se sacudió en un agitador de placas a 25 ºC durante 30 minutos; y

1.3.7: Se uso el MICROPLATE READER M1000pro (Lector de Micro placas) para leer los valores de fluorescencia.

1.4 Procesamiento de datos:

La tasa de inhibición de cada compuesto en cada punto de concentración se calculó mediante la siguiente fórmula y el ajuste de la curva se llevó a cabo usando el software GraphPad Prism 5 para obtener el valor IC_{50}.

$$\text{tasa de inhibición en cada punto de concentración (inh\%)} = \frac{\text{valor de fluorescencia en la concentración de punto cero} - \text{valor de fluorescencia en cada punto de concentración}}{\text{valor de fluorescencia a concentración cero}} \times 100\%$$

1.5 Resultados de la prueba:

Los efectos inhibidores de LY2835219 divulgados por el documento WO2010075074 y de los compuestos de los Ejemplos 1 - 43 sobre CDK1 / CiclinaA2 y CDK6 / CiclinaD3 se expresan por medio de IC_{50}, y los resultados específicos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de detección de actividad inhibitoria de los compuestos de prueba sobre CDK1 / CiclinaA2 y CDK6 / CiclinaD3 (IC_{50}: nM)

Ejemplos	CDK1/CiclinaA2	CDK6/CiclinaD3	CDK1/CDK6
LY2835219	319.43	3.81	83.83
1	2223.92	43.03	51.68
2		158.7	-
3	1678	79.06	21.22
4	-	2147	-
5	438.5	7.528	58.23
6	152.2	6.45	23.59
7	83.83	3.26	25.71
8	-	85.77	-
9	268.28	20.42	13.13
10	435.68	47.11	9.25
11	110.06	5.62	19.58
12	1071.23	3.78	283.33
13	327.00	0.39	838.46
14	233.64	4.07	57.40
15	26.92	4.31	6.25
16	95.70	9.02	10.61
17	2707.11	0.73	3708.37
18	189.86	2.74	69.29
19	64.82	65.49	0.99
20	1444.45	87.60	16.49
21	135.19	27.67	4.89
22	915.35	52.50	17.43
23	50.27	4.53	11.10
24	76.44	12.86.	5.94
25	417.16	8.78	47.51
26	216.08	12.51	17.27
27	1160.23	16.21	71.57
28	328.47	6.24	52.63
29	82.42	3.145	26.20
30	176.58	0.49	360.37
31	-	58.84	-
32	142.03	10.14	14.01
33	166.28	15.61	10.65
34	111.59	5.13	21.75
35	64.03	8.74	7.33
36	100.9	3.79	26.65

Ejemplos	CDK1/CiclinaA2	CDK6/CiclinaD3	CDK1/CDK6
37	73.67	22.87	3.22
38	19.83	0.20	99.15
39	38.51	5.65	6.82
40	161.60	24.97	6.47
41		76.65	
42	3681.98	2.33	1580.25
43	268.90	0.90	298.78
44	-	37.5	-
45	-	43.9	-

Los efectos inhibidores de algunos compuestos representativos de la presente invención sobre CDK9 / CiclinaD3, Pim-1 y CDK2 / CiclinaE1 y CDK4 / CiclinaE1 se muestran en la Tabla 2, la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente.

Tabla 2: Resultados de detección de la actividad inhibidora de algunos compuestos de prueba sobre CDK9 / CiclinaD3 (IC_{50}: nM)

Ejemplos	CDK1/CiclinaA2	CDK6/CiclinaD3	CDK9/CiclinaD3	CDK1/CDK6	CDK9/CDK6
LY2835219	319.43	3.81	5.08	83.83	1.33
1	2223.92	43.03	244.97	51.68	5.69
3	1678	79.06	50.02	21.22	0.63
6	152.2	6.45	0.42	23.59	0.06
7	83.83	3.26	4.58	25.71	1.40
9	268.28	20.42	14.43	13.13	0.71
10	435.68	47.11	27.04	9.25	0.57
12	1071.23	3.78	57.19	283.33	18.75
13	327.00	0.39	2.56	838.46	6.56
16	95.70	9.02	16.37	10.61	1.81
17	2707.11	0.73	5.36	3708.37	7.33
18	189.86	2.74	1.00	69.29	0.36
20	1444.45	87.60	0.24	16.49	0.003
22	915.35	52.50	0.50	17.43	0.009
24	76.44	12.86.	1.74	5.94	0.13
25	417.16	8.78	1.09	47.51	0.12
26	216.08	12.51	10.95	17.27	0.88
27	1160.23	16.21	2.83	71.57	0.17
28	328.47	6.24	0.96	52.63	0.15
30	176.58	0.49	0.43	360.37	0.88

Tabla 3: Resultados de detección de la actividad inhibidora de algunos compuestos de prueba sobre Pim-1 (IC_{50}: nM)

Ejemplos	CDK1/ CiclinaA2	CDK6/ CiclinaD3	CDK9/ CiclinaD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
LY2835219	319.43	3.81	5.08	3.92	83.83	1.33	1.03
1	2223.92	43.03	244.97	220.42	51.68	5.69	5.12
3	1678	79.06	50.02	197.8	21.22	0.63	2.50
6	152.2	6.45	0.42	15.09	23.59	0.06	2.33
7	83.83	3.26	4.58	461.39	25.71	1.40	141.53
9	268.28	20.42	14.43	173.89	13.13	0.71	8.51
12	1071.23	3.78	57.19	15.11	283.33	18.75	3.99

Ejemplos	CDK1/ CiclinaA2	CDK6/ CiclinaD3	CDK9/ CiclinaD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
13	327.00	0.39	2.56	2.22	838.46	6.56	5.69
14	233.64	4.07	-	28.65	57.40	-	7.03
16	95.70	9.02	16.37	686.40	10.61	1.81	76.10
17	2707.11	0.73	5.36	38.27	3708.37	7.33	52.43
24	76.44	12.86	1.74	72.81	5.94	0.13	5.66

Tabla 4: Efecto inhibidor de una parte de los compuestos de prueba sobre CDK4 y CDK2 (IC_{50}: nM)

Ejemplos	CDK1/ CiclinaA2	CDK2/ CiclinaE1	CDK4/ CiclinaE1	CDK6/ CiclinaD3	CDK9/ CiclinaD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
LY2835219	319.43	769.22-	14.83	3.81	5.08	3.92	83.83	1.33	1.03
6	152.2	-	80.9	6.45	0.42	15.09	23.59	0.06	2.33
12	1071.23	394.21	4.46	3.78	57.19	15.11	283.33	18.75	3.99
17	2707.11	2320.88	2.62	0.73	5.36	38.27	3708.37	7.33	52.43

1.6 Conclusión de la prueba:

1) Los compuestos de la presente invención tienen un efecto inhibidor significativo sobre CDK6 y CDK4.

2) CDK1 / CDK6, CDK9 / CKD6 y Pim-1 / CDK6 pueden reflejar la selectividad del compuesto para las proteínas quinasas. Cuanto mayor sea el número, mejor será la selectividad del compuesto para CDK6, lo cual indica que la toxicidad del compuesto para inhibir la pan-quinasa puede ser menor. El compuesto de control (LY2835219) exhibe CDK1 / CDK6 = 83.83, CDK9 / CDK6 = 1.33, y Pim-1 / CDK6 = 1.03; algunos de los compuestos de la presente invención muestran una mejor selectividad que el compuesto LY2835219, especialmente el compuesto preparado en el Ejemplo 17 muestra una mayor actividad enzimática para CDK6 y una mejor selectividad para CDK1, CDK9 y Pim1.

Ejemplo Experimental 2

Medición del efecto inhibidor de los compuestos representativos de la presente invención sobre la proliferación de células de cáncer de mama humano MDB-MA-231

2.1 Materiales experimentales: células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 adquiridas del Centro de Recursos Celulares del Colegio Médico Unión de Pekin (Cell Resource Center of Peking Union Medical College), DAPI (5 mg / ml, Beyotime, c1002), paraformaldehído

al 4% (DINGGUO BIOTECHNOLOGY CO. LTD, AR-0211), Placa de 96 pocillos con fondo transparente negro (PE, 6005182), en Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare).

2.2 Preparación experimental:

2.2.1 Preparación de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 medio: RPIM1640 + 10% de SFB + 1% de penicilina / estreptomicina

2.2.2 Preparación de soluciones de compuestos de prueba y soluciones de LY2835219 estándar:

(1) Preparación de soluciones de LY2835219 estándar

a. Se tomaron 3.6 µl de 10 mM de solución madre estándar, se añadieron a 6.4 µl de medio y se mezclaron bien; luego se añadieron 90 µl de medio y se mezclaron bien; luego se agregaron 200 µl de medio y se mezclaron bien para dar una concentración inicial de 20 mM;

b. Se añadieron 200 µl de medio que contiene DMSO al 0,2% (dimetilsulfóxido) en B2 a B10 de una placa de 96 pocillos; se añadieron 300 µl de la solución anterior a B1; y

c. Se tomaron 100 µl de solución del pocillo B1, se añadieron a B2 y se mezclaron bien; luego se tomaron 100 µl de la solución resultante y se añadieron a B3, y la dilución se llevó a cabo en secuencia hasta B9, de manera que se obtuvieron soluciones estándar diluidas secuencialmente por 3 veces.

(2) Preparación de soluciones de compuestos de prueba

a. Se tomó una solución de compuesto de prueba a una cierta concentración, y se diluyó con un medio para dar una solución de compuesto con una concentración final de 20 µM;

b. Se añadieron 200 µl de medio que contiene DMSO al 0.2% (dimetilsulfóxido) en H2 a H10 de la placa de 96 pocillos; y 300 µl de la solución anterior se añadieron a H1; y

c. Se tomaron 100 µl de solución del pocillo H1, se añadieron a H2 y se mezcló bien; luego se tomaron 100 µl de la solución resultante y se añadieron a H3, y la dilución se llevó a cabo en secuencia hasta B9, de manera que se obtuvieron soluciones de compuesto de prueba diluidas secuencialmente por 3 veces.

2.3 Proceso experimental:

2.3.1: Se inocularon células MDA-MB-231 en una placa de células de 96 pocillos con fondo transparente negro a razón de 4000 células / 100 µl / pocillo, y se cultivaron durante la noche a 37 °C;

2.3.2: Las muestras anteriores se añadieron a razón de 100 µl / pocillo a una placa de cultivo inoculada con células, se palmeó suavemente para mezclar bien y se incubó a 37 °C durante 72 h;

2.3.3: Fijación: se extrajo la placa de células, se retiró el medio y se añadieron 50 µl de paraformaldehído al 4% por pocillo para fijación durante 10 minutos;

2.3.4: Se añadieron 50 µl de glicina 0,1 M para neutralizar durante 10 minutos;

2.3.5: Se usó PBS 1× (tampón fosfato pH 7.2) para lavar dos veces;

2.3.6: Permeabilización: se añadieron 50 µl de TritonX-100 al 0.2% (Triton) por pocillo, y la permeabilización se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos;

2.3.7: Se usó PBS 1× (tampón fosfato pH 7.2) para lavar dos veces;

2.3.8: Se diluyó 5 mg / ml de solución madre DAPI a una proporción de 1: 5000 (concentración final de 1 µg / ml) y se realizó la tinción a temperatura ambiente durante 20 minutos;

2.3.9: Se usó PBS 1× (tampón de fosfato pH 7.2) para lavar tres veces; y

2.3.10: El escaneo y el análisis se realizaron mediante el analizador de células (In cell analyzer).

2.4 Procesamiento de datos:

La tasa de inhibición de cada compuesto en cada punto de concentración se calculó mediante la fórmula siguiente y el ajuste de la curva se llevó a cabo mediante el software GraphPad Prism 5 para obtener el valor IC_{50}.

$$\text{tasa de inhibición en cada punto de concentración (inh\%)} = \frac{\text{valor de celulas en concentración de punto cero} - \text{valor de celulas en cada punto de concentración}}{\text{valor de celulas en concentración de punto cero}} \times 100\%$$

2.5 Determinación de Resultados:

Los resultados de la detección de la actividad citológica del compuesto LY2835219 divulgados por el documento WO2010075074 y de los compuestos de los Ejemplos 12 y 17 se expresaron por IC_{50}, y los resultados específicos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Actividad inhibidora de los compuestos representativos de la presente invención sobre la proliferación de células de cáncer de mama humano MDB-MA-231 (IC_{50}: nM)

Ejemplos	IC_{50}
LY2835219	229.05
12	182.72
17	109.82

2.6 Conclusión experimental:

Los compuestos de los Ejemplos 12 y 17 tienen una actividad inhibidora significativa sobre la proliferación de la línea celular MDA-MB-231, y los compuestos representativos de la presente

invención tienen una mayor actividad inhibidora de la proliferación con respecto al compuesto de control LY2835219.

Ejemplo experimental 3

Determinación de farmacocinética en rata de los compuestos representativos de la presente invención

3.1 Resumen experimental

Se usaron ratas SD como animales de prueba, y las concentraciones de los fármacos en el plasma de las ratas en diferentes puntos de tiempo después de la administración intravenosa y la administración intragástrica de los compuestos representativos se determinaron por medio de LC / MS / MS, de forma que se estudie el comportamiento farmacocinético de los compuestos de la presente invención en ratas y se evalúen las características farmacocinéticas de estas.

3.2 Esquema Experimental

3.2.1 Fármacos de ensayo:

El compuesto preparado en el Ejemplo 17 de la presente invención.

Fármaco de control LY2835219, preparado por nosotros mismos.

3.2.2 Animales de prueba:

12 ratas SD adultas sanas, macho, 6-8 semanas de edad, con un peso de 200 - 250g, compradas a Suzhou ZhaoYan New Drug Research Center Co., Ltd., licencia de producción animal: SCXK (Su) 2013-0003

3.2.3 Preparación de los fármacos de prueba

Administración intragástrica: se pesó una cantidad apropiada de muestra y se le agregaron hidroxietilcelulosa 0.1% / Tween 80 0.5% a un volumen final para dar una solución de 1 mg / ml.

Inyección intravenosa: se pesó una cantidad apropiada de muestra y se le agregaron 10% de N-metil-2-pirrolidona y 90% de sulfobutil-β-ciclodextrina al 18% hasta un volumen final para dar una solución de 0.4 mg / ml para inyección intravenosa.

3.2.4 Administración de los fármacos de prueba

Administración intravenosa: para cada compuesto de prueba, se le administraron a 3 ratas SD macho por vía intravenosa, una dosis de 2 mg / kg y un volumen de administración de 1 ml / kg después de ayunar durante la noche.

Administración intragástrica: para cada compuesto de prueba, se le administraron a 3 ratas SD macho por vía intragástrica, una dosis de 5 mg / kg y un volumen de administración de 5 ml /

kg después de ayunar durante la noche.

3.3 Operación experimental

Antes de la administración y 0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, se tomó sangre a través de la cánula de la arteria carótida. La sangre entera se anticoaguló con EDTA-K2 y se centrifugó, el sobrenadante se eliminó y el residuo se congeló a -20 °C hasta el análisis de la muestra. Las muestras de plasma se analizaron por LC-MS / MS, el pretratamiento de la muestra se realizó utilizando el método de precipitación de proteínas, el rango lineal de análisis de muestras fue de 1 - 2000 ng / ml, y el límite de cuantificación más bajo fue de 1 ng / ml.

3.4 Resultados de datos farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de los compuestos de la presente invención se muestran en la Tabla 6 y en la Tabla 7.

Tabla 6: Parámetros PK del compuesto 17 de la presente invención en ratas sometidas a administración intravenosa única (Media ± SD)

Parámetros PK	LY2835219	Ejemplo 17
Vida media T1/2(hr)	3.69±1.40	8.67±4.98
Área bajo la curva AUC_{0-t}(ng·hr/mL)	1499±337.3	1018±239
Área bajo la curva $AUC_{0-\infty}$(ng·hr/mL)	1535±346.9	1220±456
Volumen Aparente de Distribución V_Z(L/Kg)	6.95±2.43	19.42±5.89
Tasa de depuración Cl (mL/min/kg)	22.4±4.49	30.0±11.1
Tiempo de retención MRT(hr)	3.82±1.44	7.78±1.30

Tabla 7: Parámetros PK del compuesto 17 de la presente invención en ratas sometidas a administración intragástrica única (Media ± SD)

Parámetros PK	LY2835219	Ejemplo 17
Vida media T1/2(hr)	4.07	2.00
Concentración de sangre C_{max}(ng/mL)	312±33.0	188±75
Área bajo la curva AUC_{0-t}(ng·hr/mL)	3275±731	2608±1217.8
Área bajo la curva $AUC_{0-\infty}$(ng·hr/mL)	3438	5256
Tiempo de retención MRT(hr)	7.97±1.17	10.21±0.27
Biodisponibilidad (%)	87.4	102.5

3.5 Conclusión experimental: El compuesto representativo de la presente invención (preparado en el Ejemplo 17) tiene una mayor biodisponibilidad en ratas en relación con el compuesto LY2835219, y tiene un buen efecto absorbente oral.

Ejemplo Experimental 4

Determinación farmacocinética de compuestos representativos de la presente invención en ratones.

4.1 Resumen experimental

Se usaron ratones ICR como animales de ensayo, y las concentraciones de los fármacos en el plasma de los ratones en diferentes puntos de tiempo después de la administración intragástrica y la administración intravenosa del compuesto representativo de la presente invención se determinaron por LC / MS / MS, de manera que se estudie el comportamiento farmacocinético de los compuestos de la presente invención en ratones y se evalúen las características farmacocinéticas de los mismos.

4.2 Esquema Experimental

4.2.1 Fármacos de ensayo:

El compuesto preparado en el Ejemplo 17 de la presente invención.

Fármaco de control LY2835219, preparado por nosotros mismos.

4.2.2 Animales de prueba:

12 ratones ICR adultos sanos, machos, 6-8 semanas de edad, con un peso de 20 - 25 g, comprados de Suzhou ZhaoYan New Drug Research Center Co., Ltd. Licencia de Producción Animal No. SCXK (Su) 2013-0003

4.2.3 Preparación de los fármacos de prueba

Se pesó una cantidad apropiada de muestra y se le agregaron hidroxietilcelulosa 0.1% / Tween 80 0.5% a un volumen final para dar una solución de 0.5 mg / ml para administración intragástrica.

Se pesó una cantidad apropiada de muestra y se le agregó 10% de N-metil-2-pirrolidona y 90% de sulfobutil-β-ciclodextrina al 18% hasta un volumen final para dar una solución de 0.2 mg / ml para administración intravenosa.

4.2.4 Administración de los fármacos de prueba

Para cada fármaco de prueba, a 3 ratones ICR macho se les administró por vía intragástrica una dosis de 5 mg / kg y un volumen de administración de 10 ml / kg después de ayunar durante la noche.

Para cada fármaco de prueba, a 3 ratones ICR macho se les administró por vía intravenosa una dosis de 2 mg / kg y un volumen de administración de 10 ml / kg después del ayuno durante la noche.

4.3 Operación experimental

Antes de la administración y 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, se tomó sangre del grupo que fue administrado por vía intragástrica a través de una cánula en la

arteria carótida. La sangre entera se anticoaguló con EDTA-K2 y se centrifugó, el sobrenadante se eliminó y el residuo se congeló a -20 °C hasta el análisis de la muestra. Antes de la administración y 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la administración, la sangre del grupo que fue administrado por vía intravenosa se tomó a través una cánula en la arteria carótida. Las muestras de plasma se trataron en la misma manera que la empleada para muestras de plasma del grupo administrado por vía intragástrica. Las muestras de plasma se analizaron por medio de LC-MS / MS, el pretratamiento de la muestra se realizó utilizando el método de precipitación de proteínas, el rango lineal de análisis de muestras fue de 1 - 2000 ng / ml y el límite de cuantificación más bajo fue de 1 ng / ml.

4.4 Resultados de datos farmacocinéticos: ver Tabla 8 y Tabla 9.

Tabla 8: Parámetros PK del compuesto 17 de la presente invención en ratones sometidos a administración intravenosa única (Media ± SD)

Parámetros PK	LY2835219	Ejemplo 17
Vida media T1/2(hr)	1.68±0.10	9.1±0.26
Área bajo la curva AUC_{0-t}(ng·hr/mL)	674±82.1	1137±77.8
Área bajo la curva $AUC_{0-\infty}$(ng·hr/mL)	679±81.0	1327±4
Volumen aparente de distribución V_Z(L/Kg)	7.21±1.08	19.8±0.81
Tasa de depuración Cl (mL/min/kg)	49.6±5.72	25.2±1.72
Tiempo de retención MRT(hr)	1.64±0.17	7.51±0.28

Tabla 9: Parámetros PK del compuesto 17 de la presente invención en ratones sometidos a administración intragástrica única (Media ± SD)

Parámetros PK	LY2835219	Ejemplo 17
Vida media T1/2(hr)	1.70±0.02	8.38±3.16
Concentración de sangre C_{max}(ng/mL)	154±6.4	134±11.8
Área bajo la curva AUC_{0-t}(ng·hr/mL)	756±34	2134±96.9
Área bajo la curva $AUC_{0-\infty}$(ng·hr/mL)	765±34	2504±387
Tiempo de retención MRT(hr)	3.08±0.02	9.45±1.05
Biodisponibilidad (%)	45.1	75.1

4.5 Conclusión experimental: El compuesto representativo 17 de la presente invención tiene una mayor biodisponibilidad y una vida media más larga en ratones en relación con el compuesto LY2835219, y tiene un buen efecto absorbente oral.

Ejemplo Experimental 5

Determinación de los niveles de exposición en plasma y cerebro del compuesto representativo 17 de la presente invención

5.1 Resumen experimental

Se usaron ratones CD-1 como animales de ensayo, las concentraciones de los fármacos en el plasma y tejido cerebral de ratones en diferentes puntos de tiempo después de la administración intragástrica única del compuesto representativo de la presente invención se determinaron por medio de LC / MS / MS, de manera que se estudie el nivel de plasma y el nivel de exposición cerebral de los compuestos de la presente invención en ratones.

5.2 Esquema Experimental

5.2.1 Fármacos de ensayo:

El compuesto preparado en el Ejemplo 17 de la presente invención.

Fármaco de control LY2835219, preparado por nosotros mismos.

5.2.2 Animales de prueba:

24 ratones CD-1 adultos sanos, machos, 6 - 8 semanas de edad, peso corporal 20 - 25 g, comprados a Shanghai sippr BK Laboratory Animal Co., Ltd., Licencia de Producción Animal: SCXK (Shanghai) 2013-0016.

5.2.3 Preparación de los fármacos de prueba

Se pesó una cantidad apropiada de muestra y se le agregaron hidroxietilcelulosa 0.1% / de Tween 80 0.5% a un volumen final para dar una solución de 1.0 mg / ml.

5.2.4 Administración de fármacos de prueba

Para cada fármaco de prueba, a 12 ratones CD-1 machos se les administró por vía intragástrica a razón de una dosis de 10 mg / kg y un volumen de administración de 10 ml / kg después de ayunar durante la noche.

5.3 Operación experimental

LY2835219: antes de la administración y 0.25, 1.5 y 6 horas después de la administración, se tomó sangre a través de una cánula en la arteria carótida y tres ratones fueron sacrificados al mismo tiempo. El cerebro entero fue recolectado, macerado y congelado en nitrógeno líquido. 10 horas después de la administración, se sacrificaron los animales restantes, se recogió la sangre entera mediante punción cardíaca y se recolectó el cerebro entero, se maceró y se congeló en nitrógeno líquido.

Ejemplo 17: antes de la administración y 2, 4 y 24 horas después de la administración, se tomó sangre a través de una cánula en la arteria carótida y tres ratones fueron sacrificados al mismo tiempo. El cerebro entero fue recolectado, macerado y congelado en nitrógeno líquido. 48 horas después de la administración, los animales restantes fueron sacrificados, se recolectó la sangre entera mediante punción cardíaca, y el cerebro entero fue recolectado, macerado y

congelado en nitrógeno líquido.

Tratamiento de la muestra de sangre entera: la sangre entera recolectada se anticoaguló con EDTA-K2, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el residuo se congeló y almacenó a -20 °C hasta que la muestra se analizó mediante LC-MS / MS.

Muestreo de homogeneizado de cerebro: el homogeneizado de cerebro se dispersó con PBS (pH = 7.4): solución de MeOH (v: v, 2: 1) en un volumen de 5 veces el volumen del homogeneizado de cerebro. Se tomaron 100 µl de solución, y la proteína contenida en esta se precipitó con 600 µl de IS. La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm y 20 – 25 ºC durante 15 minutos. Se mezclaron 50 µL del sobrenadante con 150 µL de agua que contenía FA 0, 3% y se centrifugó a 4 °C. Se analizaron 5 µL de la muestra por medio de LC-MS / MS.

El rango lineal del análisis de la muestra fue de 1 - 2000 ng / ml, y el límite de cuantificación más bajo fue de 1 ng / ml.

5.4 Los resultados de la medición del nivel de exposición del cerebro y sangre se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Exposición media del compuesto de prueba en plasma y cerebro de ratones CD-1

Parámetros		LY2835219	17
Concentración de sangre C_{max}(ng/mL)	Plasma	836	639
	Cerebro	188	1270
	Cerebro / plasmad	0.22	1.98
Tiempo para que la concentración sanguínea alcance su pico T_{max} (h)	Plasma	1.50	4.00
	Cerebro	6.00	4.00
Área bajo la curva $AUC_{0\text{-last}}$(ng·hr/mL)	Plasma	4247	7661
	Cerebro	1113	16786
	Cerebro / plasma	0.28	2.19

5.5 Conclusión experimental: El compuesto representativo de la presente invención (preparado en el Ejemplo 17) tiene una mejor distribución cerebro sangre, una relación $AUC_{0\text{-last}}$ mayor (cerebro / plasma) y una relación C_{max} mayor (cerebro / plasma) con respecto al compuesto LY2835219, y el T_{max} en el cerebro equivale a T_{max} en el plasma, lo que indica que el fármaco tiene un comportamiento PK similar en el cerebro y en el plasma. Esto sugiere que los compuestos de la presente invención pueden cruzar la barrera hematoencefálica para inhibir el crecimiento de tumores cerebrales (cáncer cerebral) y tratar el cáncer cerebral.

Experimental Ejemplo 6

Determinación del efecto inhibidor del compuesto representativo 17 de la presente invención

sobre la proliferación de la línea celular U87 MG.

6.1 Materiales experimentales: se adquirió la línea celular de glioma humano U87 MG del Banco de células de la Academia de Ciencias de China, Shanghai (Cell Bank of Chinese Academy of Sciences, Shanghai) DAPI (5 mg / mL, Beyotime, c1002), paraformaldehído al 4% (DINGGUO BIOTECHNOLOGY CO. LTD AR-0211), placa de 96 pocillos con fondo transparente negro (PE, 6005182), In Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare).

6.2 Preparación experimental:

6.2.1 Preparación del medio U87 MG: RPIM1640 + 10% FBS + 1% de penicilina / estreptomicina

6.2.2 Preparación de soluciones de compuestos de prueba y soluciones LY2835219 estándar:

(1) Preparación de soluciones LY2835219 estándar

a. Se tomaron 3,6 µl de 10 mM de solución madre estándar, se añadieron a 6,4 µl de medio y se mezcló bien; luego se añadieron 90 µl de medio y se mezcló bien; luego se añadieron 200 µl de medio y se mezcló bien para dar una concentración inicial de 20 µM.

b. Se añadieron 200 µl de medio que contenía DMSO 0,2% (dimetilsulfóxido) en B2 a B10 de una placa de 96 pocillos; se añadieron 300 µl de la solución anterior en B1;

c. Se tomaron 100 µl de solución del pocillo B1, se añadieron a B2 y se mezcló bien; luego se tomaron 100 µl de la solución resultante y se añadieron a B3, y la dilución se llevó a cabo en secuencia hasta B9, de manera que se obtengan soluciones estándar diluidas secuencialmente por 3 veces.

(2) Preparación de soluciones de compuestos de prueba:

a. Se tomó una solución de compuesto de prueba a una cierta concentración, y se diluyó con un medio para dar una solución de compuesto con una concentración final de 20 µM;

b. Se añadieron 200 µl de medio que contenía DMSO 0.2% (dimetilsulfóxido) en H2 hasta H10 de la placa de 96 pocillos; y 300 µl de la solución anterior se añadieron a H1;

c. Se tomaron 100 µl de solución del pocillo H1, se añadieron en H2 y se mezcló bien; luego se tomaron 100 µl de la solución resultante y se añadieron en H3, y la dilución se llevó a cabo en secuencia hasta H9, de manera que se obtengan soluciones de compuesto de prueba secuencialmente diluidas por 3 veces.

6.3 Proceso experimental:

6.3.1: Se inocularon células U87 MG en una placa de 96 pocillos con fondo transparente negro a razón de 4000 células / 100 µl / pocillo, y se cultivaron a 37 ºC durante la noche;

6.3.2: Las muestras anteriores se añadieron a razón de 100 µl / pocillo a una placa de cultivo inoculada con células, se palmeó suavemente para mezclar bien y se incubó a 37 °C durante 72 horas;

6.3.3: Fijación: se extrajo la placa de células, se retiró el medio y se añadieron 50 µl de paraformaldehído 4% por pocillo para fijar durante 10 minutos;

6.3.4: Se añadieron 50 µl de 0.1 M de glicina para neutralizar durante 10 minutos;

6.3.5: Se usó PBS 1× (tampón fosfato pH 7.2) para lavar dos veces;

6.3.6: Permeabilización: se añadieron 50 µl de TritonX-100 0.2% (Triton) por pocillo, y la permeabilización se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos;

6.3.7: Se usó PBS 1× (tampón fosfato pH 7.2) para lavar dos veces;

6.3.8: Se diluyeron 5 mg / ml de solución madre DAPI en una proporción de 1: 5000 (concentración final de 1 µg / ml) y se realizó la tinción a temperatura ambiente durante 20 minutos;

6.3.9: Se usó PBS 1× (tampón fosfato pH 7.2) para lavar tres veces; y

6.3.10: El escaneo y el análisis se realizaron por medio del *In cell analyzer*.

6.4 Procesamiento de datos:

La tasa de inhibición de cada compuesto en cada punto de concentración se calculó por medio de la fórmula de la siguiente manera y el ajuste de la curva se realizó mediante el software GraphPad Prism 5 para obtener el valor IC_{50}.

$$\text{tasa de inhibición en cada punto de concentración (inh\%)} = \frac{\text{valor de celulas en concentración de punto cero} - \text{valor de celulas en cada punto de concentración}}{\text{valor de celulas en concentración de punto cero}} \times 100\%$$

6.5 Determinación de Resultados:

Los resultados de la detección de la actividad citológica de LY2835219 divulgados por el documento WO2010075074 y el compuesto de Ejemplo 17 se expresaron por medio de IC_{50}, y los resultados específicos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Actividad inhibitoria del compuesto representativo de la presente invención sobre la proliferación de la línea celular U87MG (IC_{50}: nM)

Ejemplos	IC_{50}
LY2835219	150.70
17	35.43

6.6 Conclusión experimental:

El compuesto del Ejemplo 17 tiene una actividad inhibidora significativa sobre la proliferación de la línea celular U87MG, y el compuesto representativo de la presente invención tiene una mayor actividad inhibidora de la proliferación en relación con el compuesto de control LY2835219.

Ejemplo Experimental 7

Estudio farmacodinámico del compuesto 17 de la presente invención y la combinación del compuesto 17 de la presente invención y temozolomida en un modelo de xenoinjerto cerebral ortotópico U87-luc

7.1 Resumen experimental

Se utilizaron ratones BALB / c desnudos adultos hembra como animales de prueba. Se utilizó un modelo de xenoinjerto cerebral ortotópico U87-luc para estudiar el efecto del compuesto representativo 17 de la presente invención sobre la supervivencia media de ratones desnudos hembra BALB / c después de la administración intragástrica.

7.2 Esquema Experimental

7.2.1 Fármacos de prueba:

El compuesto preparado en el Ejemplo 17 de la presente invención.

Fármaco de control LY2835219, hecho por nosotros mismos.

Temozolomida se le compró a la empresa *Selleck*.

7.2.2 Animales de prueba:

Ratones BALB / c desnudos sanos adultos hembra, 8 ratones / grupo, 6 - 8 semanas de edad, con un peso de 18 - 22 g, comprados a Shanghai sippr BK Laboratory Animal Co., Ltd., licencia de producción animal: 2008001658261; 2008001658263.

7.2.3 Preparación de los compuestos de prueba

Se pesó una cantidad apropiada del compuesto 17 y se le añadió hidroxietilcelulosa 0.1% / Tween 80 0.5% como vehículo hasta 0.3125 mg / ml;

Se pesó una cantidad apropiada de la muestra de temozolomida y se le añadió CMC-Na 0.1% + Tween 80 0.25% como vehículo hasta 0.3 mg / ml.

7.3 Modelo de xenoinjerto de cerebro ortotópico

Ratones BALB/c desnudos adultos hembra fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 80 mg / kg. Para aliviar el dolor, a los animales se les inyectó buprenorfina por vía subcutánea en los puntos de tiempo 30 minutos antes

de la operación y 6 horas después de la operación a una dosis de 0.1 mg / kg. Los animales fueron observados después de la anestesia hasta que todos los animales se despertaron.

Los animales anestesiados se fijaron correctamente, la piel de la cabeza de los animales se esterilizó con etanol 70% y se realizó una incisión de aproximadamente 10 mm de largo en el lado derecho de la línea media desde la frente hasta la línea de la oreja. Se inocularon 3×10^5 células U87-luc (3 µl, mezcla de PBS y Matrigel en una proporción de 4: 1) en el lóbulo frontal derecho que está a 2 mm de distancia del lado derecho del bregma y a 1 mm de distancia del lado frontal de la sutura coronal en cada animal. La incisión se suturó con sutura No. 6 y se esterilizó con polivinilpirrolidona. Los animales se mantuvieron calientes hasta la anabiosis. 6 días después del trasplante de células tumorales, los animales tumorales se agruparon por asignación aleatoria estratificada con base en los valores de intensidad de la señal de fluorescencia, y la bioluminiscencia promedio alcanzó 2.812E + 07 fotones / seg cuando los grupos fueron administrados en grupos. A diferentes grupos de animales se le administraron dosis diferentes durante un total de 35 días.

7.4 Mediana de supervivencia (días) del compuesto 17 de la presente invención y la combinación del compuesto 17 de la presente invención con Temozolomida en un modelo de xenoinjerto de cerebro ortotópico U87-luc.

Tabla 12: Mediana de supervivencia causada por el compuesto 17 y la combinación del compuesto 17 con temozolomida

Grupos	Supervivencia media (días)	valor[b] P	valor[c] P
Vehículo	30(29-37)[a]	-	-
Compuesto 17 3.125 mg/kg QD	38.5(26-59)	0.0822	-
Compuesto 17 6.25 mg/kg QD	43.5(31-48)	0.0007	-
Compuesto 17 12.5 mg/kg QD	44.5(31-114)	0.0004	-
Compuesto 17 25 mg/kg QD	61(41-76)	<0.0001	-
Compuesto 17 50 mg/kg QD	78.5(63->114)	<0.0001	-
Temozolomida 3 mg/kg IP Día 0, 7, 14, 21 y 28	47(38-83)	<0.0001	-
Compuesto 17 6.25 mg/kg QD + Temozolomida 3 mg/kg IP Día 0, 7, 14, 21 y 28	57(42->114)	<0.0001	0.0454

a. Rango de tiempo de supervivencia.

b. Valores p cuando cada grupo se comparó con el grupo de Vehículo.

c. Valores p cuando cada grupo se comparó con el grupo de dosis única de temozolomida.

7.5 Conclusión experimental: El compuesto representativo 17 de la presente invención puede prolongar significativamente la mediana de supervivencia de animales en un modelo de xenoinjerto de cerebro ortotópico U87-luc de una manera dependiente de la dosis. En el estudio

sobre medicación combinada con temozolomida, la medicación combinada prolonga aún más la mediana de supervivencia de los animales en comparación con la temozolomida utilizada sola.

En resumen, la presente invención proporciona una serie de compuestos novedosos que tienen actividad inhibidora de quinasa CDK4 / 6 selectiva la cual es superior o comparable a la del compuesto LY2835219, un fármaco candidato actualmente en ensayos clínicos de Fase III, con algunos de los compuestos que exhiben mejor selectividad. Además, el compuesto preferido exhibe un buen efecto de absorción oral y una buena distribución hematoencefálica, y tiene un efecto farmacológico significativo sobre el modelo de xenoinjerto cerebral ortotópico U87-luc, lo que sugiere que los compuestos de la presente invención prometen ser desarrollados en nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la proliferación celular, en particular tumores malignos, especialmente cánceres cerebrales, y ofrecer nuevas opciones para médicos y pacientes.

Kits

La presente invención también proporciona un kit que comprende los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos, o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII, o su respectivo tautómero, mesómero, racemato, enantiómero, diastereómeros, compuesto deuterado, profármaco o mezcla de los mismos.

Adicionalmente, el kit puede comprender además instrucciones para su operación.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también se refiere a un producto de combinación para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, en donde el producto de combinación comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, y los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII, o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuesto deuterados, profármaco o mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos. Los compuestos o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos

tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas pueden estar en una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente efectiva en la composición farmacéutica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que es funcional y activa para humanos y / o animales y aceptable para humanos y / o animales.

Como se usa en el presente documento, los ingredientes "farmacéuticamente aceptables" son adecuados para uso en seres humanos y/o animales (como mamíferos o aves) sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y alergia), es decir, una sustancia con una relación razonable de riesgo / beneficio. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un vehículo para administración y puede incluir diversos excipientes y diluyentes y similares. Tales vehículos pueden incluir, pero no se limitan a, agua, solución salina normal, liposomas, lípidos, proteínas, conjugados proteína - anticuerpo, péptidos, celulosa, nanogel, solución tampón, glucosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La elección del vehículo debería ser generalmente compatible con el modo de administración, como es bien conocido por una persona experta en la técnica.

La cantidad efectiva de la presente invención puede variar dependiendo del modo de administración y la gravedad de la enfermedad a tratar. La cantidad efectiva preferida puede ser determinada por una persona experta en la técnica con base en diversos factores (por ejemplo, a través de ensayos clínicos). Tales factores incluyen, pero no se limitan a: parámetros farmacocinéticos del ingrediente activo tales como biodisponibilidad, metabolismo, vida media, etc.; la gravedad de la enfermedad del paciente a tratar, el peso corporal del paciente, el estado inmunológico del paciente, la ruta de administración, etc.

Método de tratamiento

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular, que comprende administrar a un paciente, por vía oral o no oral, una cantidad eficaz de los compuestos de fórmulas estructurales I - V y VIII, o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómero, compuesto deuterado, profármaco o mezcla de los mismos; o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas I - V y VIII o sus respectivos tautómeros, mesómeros, racematos, enantiómeros, diastereómeros, compuestos deuterados, profármacos o mezclas de los mismos, o la composición farmacéutica

mencionada anteriormente.

Las rutas orales o no orales pueden ser de administración gastrointestinal, administración nasal, administración intratraqueal, administración intrapulmonar, administración a través de las venas o de la epidermis en sitios no lesionados, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intracardíaca, administración intramuscular, administración intraósea, administración intraperitoneal, administración epidural, administración bucal, administración sublingual, administración oftálmica, administración rectal, administración vaginal, administración uretral, administración a través del canal auditivo y otras formas. Los modos preferidos de administración incluyen la administración oral, administración a través del tracto respiratorio, la inyección, administración transdérmica, administración a través de las mucosas o la administración cavitaria.

En donde, la administración oral incluye la deglución, sublingual y similares. El modo de administración a través del tracto respiratorio incluye inhalación, tal como la inhalación de atomización ultrasónica, inhalación de aerosol de atomización de oxígeno, la inhalación de atomización a presión manual y similares. El modo de administración por inyección incluye inyección arterial, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intracardíaca, inyección intradérmica y similares. Los métodos de administración transdérmica incluyen iontoforesis, electroporación y similares. El modo de administración a través de las mucosas incluye administración a través de la mucosa nasal, administración a través de la mucosa oral, administración a través de la mucosa oftálmica, administración a través de la mucosa rectal, administración a través de la mucosa uterina y administración a través de la mucosa vaginal. El modo de administración cavitaria incluye administración rectal, administración vaginal, administración uretral, administración nasal y administración a través del canal auditivo.

Todas las referencias mencionadas en la presente invención (incluyendo documentos de patente o documentos que no son de patente) se incorporan aquí como referencia, como si cada uno de ellos se incorporara individualmente por referencia.

Aunque la invención ha sido descrita con cierto margen, cambios aparentemente adecuados de diversas condiciones pueden ser llevados a cabo sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Se puede entender que la invención no se limita a las modalidades descritas, sino que se define por el alcance de las reivindicaciones, las cuales incluyen equivalentes de cada elemento descrito.