

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 774**

51 Int. Cl.:

C07D 241/02 (2006.01)

C07D 241/20 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2020 PCT/CN2020/106885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2021 WO21023192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2020 E 20849905 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023 EP 4011866**

54 Título: **Forma cristalina A y forma cristalina B del compuesto de pirazina-2(1H)-cetona y su método de preparación**

30 Prioridad:

08.08.2019 CN 201910731663

01.11.2019 CN 201911059460

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

24.11.2023

73 Titular/es:

**ZHANGZHOU PIEN TZE HUANG
PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
No. 1, Hupo Road, Xiangcheng District,
Zhangzhou
Fujian, 363000, CN**

72 Inventor/es:

**YU, JUAN;
HONG, FEI;
YIN, TINGTING;
CHEN, ZHILIANG;
ZHUANG, YICHAO;
FU, ZHIFEI;
LUO, MIAORONG;
ZHANG, YANG;
LI, JIAN y
CHEN, SHUHUI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 954 774 T3

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

DESCRIPCIÓN

Forma cristalina A y forma cristalina B del compuesto de pirazina-2(1H)-cetona y su método de preparación

La presente solicitud reivindica las siguientes prioridades:

El documento CN201910731663.3, de 8 de agosto de 2019;

5 El documento CN201911059460.0, de 1 de noviembre de 2019.

Campo de la técnica

La presente descripción se refiere a una forma cristalina de un compuesto de pirazín-2(1H)-ona y a su método de preparación, se refiere en concreto a un método de preparación de un compuesto de fórmula (II) y a una forma cristalina del mismo.

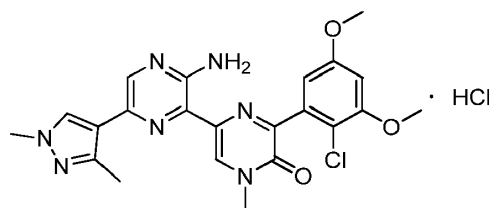
10 Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) es un receptor para la transducción de la señal del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); la familia de FGFR consiste en cuatro miembros (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4) y FGFR es una glicoproteína que consiste en un dominio extracelular de tipo inmunoglobulina (Ig), una región transmembranaria hidrófoba y una porción intracelular que incluye una región de tipo tirosina cinasa. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) desempeña una función importante en muchos procesos reguladores fisiológicos, tales como la proliferación celular, la diferenciación celular, la migración celular y la angiogénesis, a través de estos receptores (FGFR). Existen muchas pruebas que vinculan las anomalías de la vía de señalización del FGF (alta expresión, amplificación génica, mutaciones de genes, reorganización cromosómica, etc.) directamente con muchos procesos patológicos, tales como proliferación, migración, invasión y angiogénesis de células tumorales. Por lo tanto, el FGFR ha surgido como una clase importante de dianas terapéuticas que ha atraído mucho interés de investigación y desarrollo.

La solicitud de patente internacional WO2017/070708A1 describe compuestos de 2-piridazín-3(2H)-ona sustituidos con 2-arilo y 2-heteroarilo como inhibidores de la tirosina cinasa del FGFR. La solicitud de patente internacional WO2013/061081A1 describe benzopirazinas anticancerígenas a través de la inhibición de la cinasa de los FGFR. La solicitud de patente internacional WO2016/134320A1 describe heterociclos bicíclicos inhibidores del FGFR.

Contenido de la presente invención

La presente descripción proporciona una forma cristalina A de un compuesto de fórmula (II), y el patrón de difracción de rayos X en polvo del mismo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,99 \pm 0,20^\circ$, $9,54 \pm 0,20^\circ$ y $10,45 \pm 0,20^\circ$.



(II)

30 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,99 \pm 0,20^\circ$, $5,85 \pm 0,20^\circ$, $9,54 \pm 0,20^\circ$, $10,45 \pm 0,20^\circ$, $11,45 \pm 0,20^\circ$, $13,19 \pm 0,20^\circ$, $15,93 \pm 0,20^\circ$ y $19,48 \pm 0,20^\circ$.

35 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,99^\circ$, $5,85^\circ$, $9,54^\circ$, $9,94^\circ$, $10,45^\circ$, $11,45^\circ$, $13,19^\circ$, $13,92^\circ$, $14,51^\circ$, $15,11^\circ$, $15,93^\circ$, $16,86^\circ$, $17,94^\circ$, $19,48^\circ$, $19,90^\circ$, $20,80^\circ$, $21,60^\circ$, $21,97^\circ$, $23,28^\circ$, $23,66^\circ$, $25,52^\circ$, $26,19^\circ$, $27,47^\circ$, $28,66^\circ$, $29,03^\circ$ y $29,42^\circ$.

40 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) es como se muestra en la figura 1.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) son como los mostrados en la tabla 1.

Tabla 1: Datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II)

No.	Ángulo de 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)	N.º	Ángulo de 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)
1	4,988	17,7033	100,0	14	19,485	4,5518	19,2
2	5,853	15,0861	12,6	15	19,905	4,4569	11,4
3	9,539	9,2639	85,5	16	20,804	4,2662	13,5
4	9,936	8,8944	14,7	17	21,596	4,1116	7,0
5	10,446	8,4618	50,1	18	21,968	4,0427	10,5
6	11,447	7,7236	19,5	19	23,281	3,8176	5,5
7	13,194	6,7046	18,0	20	23,660	3,7573	4,9
8	13,916	6,3586	6,1	21	25,522	3,4873	15,3
9	14,513	6,0981	8,5	22	26,190	3,3998	8,1
10	15,106	5,8603	6,0	23	27,468	3,2444	4,5
11	15,933	5,5577	10,0	24	28,658	3,1124	10,3
12	16,858	5,2549	6,3	25	29,032	3,0732	9,7
13	17,944	4,9393	3,9	26	29,425	3,0330	5,1

- 5 En algunas realizaciones de la presente descripción, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II), medida a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, tiene un pico endotérmico con un inicio a 201,7 °C ± 2,0 °C, y un pico endotérmico con un inicio a 254,8 °C ± 2,0 °C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de DSC de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) es como se muestra en la figura 2.

- 10 En algunas realizaciones de la presente descripción, la curva de análisis termogravimétrico de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II), medida a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, muestra una pérdida de peso del 0,5876 % a 63,0 °C ± 3,0 °C, se produjo una pérdida de peso del 2,4156 % a 127,4 °C ± 3,0 °C, se produjo una pérdida de peso del 8,8666 % a 209,4 °C ± 3,0 °C y se produjo una pérdida de peso del 11,8416 % a 263,2 °C ± 3,0 °C.

- 15 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de TGA de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) es como se muestra en la figura 3.

La presente descripción da a conocer una forma cristalina B del compuesto de fórmula (II), y su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ, medidos a una longitud de onda λ = 1,54056 Å: 10,57 ± 0,20°, 14,59 ± 0,20° y 16,05 ± 0,20°.

- 20 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ, medidos a una longitud de onda λ = 1,54056 Å: 4,60 ± 0,20°, 10,57 ± 0,20°, 13,82 ± 0,20°, 14,59 ± 0,20°, 16,05 ± 0,20°, 19,52 ± 0,20°, 21,45 ± 0,20° y 27,16 ± 0,20°.

- 25 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ, medidos a una longitud de onda λ = 1,54056 Å: 4,60°, 5,87°, 9,06°, 9,54°, 10,57°, 11,42°, 13,21°, 13,82°, 14,59°, 16,05°, 17,23°, 18,16°, 19,52°, 20,12°, 20,22°, 21,45°, 22,00°, 22,95°, 23,61°, 24,06°, 24,61°, 25,85°, 26,29°, 27,16°, 28,44°, 28,68°, 30,94°, 32,07°, 32,40°, 33,01°, 33,94°, 34,82°, 35,64°, 36,95° y 38,88°.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) es como se muestra en la figura 4.

- 30 En algunas realizaciones de la presente descripción, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) son como los mostrados en la tabla 2.

Tabla 2: Datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II)

No.	Ángulo de 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)	N.º	Ángulo de 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)
1	4,596	19,2099	9,6	19	23,611	3,7650	3,1
2	5,874	15,0334	5,7	20	24,056	3,6963	3,0
3	9,056	9,7565	4,3	21	24,609	3,6145	2,6
4	9,538	9,2649	3,6	22	25,852	3,4434	5,8
5	10,567	8,3653	100,0	23	26,286	3,3875	7,2
6	11,416	7,7449	7,4	24	27,156	3,2810	12,2
7	13,210	6,6967	6,6	25	28,439	3,1359	4,8
8	13,822	6,4015	11,3	26	28,676	3,1104	4,6
9	14,590	6,0663	36,7	27	30,941	2,8878	1,7
10	16,050	5,5175	14,5	28	32,068	2,7888	2,7
11	17,232	5,1416	1,3	29	32,400	2,7610	1,8
12	18,161	4,8806	5,0	30	33,010	2,7113	1,2
13	19,516	4,5449	8,4	31	33,935	2,6395	2,5
14	20,120	4,4097	2,0	32	34,816	2,5747	1,2
15	20,217	4,3887	1,8	33	35,638	2,5171	1,3
16	21,454	4,1384	10,1	34	36,954	2,4305	1,1
17	21,997	4,0375	2,1	35	38,876	2,3147	1,0
18	22,950	3,8719	6,6	/	/	/	/

5 En algunas realizaciones de la presente descripción, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II), medida a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, tiene un pico endotérmico con un inicio a 224,4 °C ± 2,0 °C, y un pico endotérmico con un inicio a 257,4 °C ± 2,0 °C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de DSC de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) es como se muestra en la figura 5.

10 En algunas realizaciones de la presente descripción, la curva de análisis termogravimétrico de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II), medida a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, muestra una pérdida de peso del 0,1558 % a 90,9 °C ± 3,0 °C, se produjo una pérdida de peso del 6,6758 % a 206,5 °C ± 3,0 °C, y se produjo una pérdida de peso del 9,4648 % a 255,9 °C ± 3,0 °C.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de TGA de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) es como se muestra en la figura 6.

15 La presente descripción también da a conocer un uso de la forma cristalina A y de la forma cristalina B en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades relacionadas con el FGFR.

Efecto técnico

20 La forma cristalina A y la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) son fármacos estables y fáciles de formular. De acuerdo con las realizaciones experimentales de la sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I), se puede observar que la forma cristalina A y la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) exhiben una mejor actividad inhibidora contra el FGFR de tipo salvaje, y la selectividad por FGFR2 y 3 frente a FGFR1 y 4 es mayor. El índice farmacocinético de la forma cristalina A y de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) en los ratones es bueno.

25 La sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I) muestra una mejor actividad inhibidora contra el FGFR de tipo salvaje, y la selectividad por FGFR2 y 3 frente a FGFR1 y 4 es mayor. El índice farmacocinético de la sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I) en los ratones es bueno.

Definición y descripción

5 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases utilizados en este documento tienen los siguientes significados. Un término o frase específicos no deben considerarse indefinidos o poco claros en ausencia de una definición concreta, sino que deben entenderse en el sentido habitual. Cuando aparece un nombre comercial en este documento, se pretende hacer referencia a su correspondiente producto o ingrediente activo.

10 Los compuestos de la presente descripción se pueden preparar mediante varios métodos sintéticos conocidos por los expertos en la técnica, incluidas las realizaciones descritas a continuación, las realizaciones formadas mediante la combinación de las realizaciones descritas a continuación con otros métodos de síntesis química, y las alternativas equivalentes bien conocidas por los expertos en la técnica, en donde las realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a ellas, las realizaciones de la presente descripción.

15 Las reacciones químicas de las realizaciones de la presente descripción se llevan a cabo en un solvente adecuado, y el solvente debe ser adecuado para el cambio químico de la presente descripción y los reactivos y materiales requeridos. Para obtener los compuestos de la presente descripción, a veces es necesario que los expertos en la materia modifiquen o seleccionen las etapas de síntesis o los esquemas de reacción en función de las realizaciones existentes.

La presente descripción se describirá específicamente a continuación por medio de realizaciones, pero el alcance de la presente descripción no se limita a las mismas.

Todos los solventes usados en la presente descripción están disponibles comercialmente y pueden usarse directamente sin purificación adicional.

20 En la presente descripción se utilizan las siguientes abreviaturas: *eq* se refiere a equivalente, equivalentes; PE se refiere a éter de petróleo; DMSO se refiere a sulfóxido de dimetilo; MeOH se refiere a metanol; y TFA se refiere a ácido trifluoroacético.

25 Los solventes usados en la presente descripción están disponibles comercialmente y los compuestos disponibles comercialmente se nombran según el repertorio del proveedor. Cuando los solventes mixtos se agregan a la solución de reacción, cada solvente puede mezclarse primero y luego agregarse a la solución de reacción; o cada solvente puede añadirse a la solución de reacción cuando le toque y mezclarse en el sistema de reacción.

Los compuestos se nombran de acuerdo con los principios de nomenclatura convencionales en el campo o por el programa informático ChemDraw[®], y los compuestos disponibles comercialmente se nombran según el repertorio del proveedor.

30 **Método del difractómetro de rayos X en polvo (XRPD) en la presente descripción**

Aproximadamente de 10 a 20 mg de la muestra se sometieron a detección por XRPD.

Los parámetros detallados de la XRPD son los siguientes:

Tubo de rayos X: Cu, k2, ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$)

Voltaje del tubo de rayos X: 40 kV, corriente del tubo de rayos X: 40 mA

35 Ranura de divergencia: 0,60 mm

Rendija del detector: 10,50 mm

Rendija antidispersión: 7,10 mm

Intervalo de escaneo: 4-40°

Tamaño del paso: 0,02°

40 Duración del paso: 0,12 s

Velocidad de rotación de la bandeja de muestras: 15 rpm

Método del calorímetro diferencial de barrido (DSC) en la presente descripción

Las muestras (0,5 a 1 mg) se colocaron en un crisol de aluminio de DSC para la prueba y el método fue: de 25 °C a 300 o 350 °C, 10 °C/min.

45

Método del analizador termogravimétrico (TGA) en la presente descripción

Las muestras (2 a 5 mg) se colocaron en un crisol de platino de TGA para la prueba, en las condiciones de 25 ml/min de N₂ a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en donde la muestra se calentó desde la temperatura ambiente hasta 300 °C o hasta una pérdida de peso del 20 %.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es el patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II) medido por radiación Cu-K α .

La figura 2 es el patrón de DSC de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II).

La figura 3 es el patrón de TGA de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II).

10 La figura 4 es el patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) medido por radiación Cu-K α .

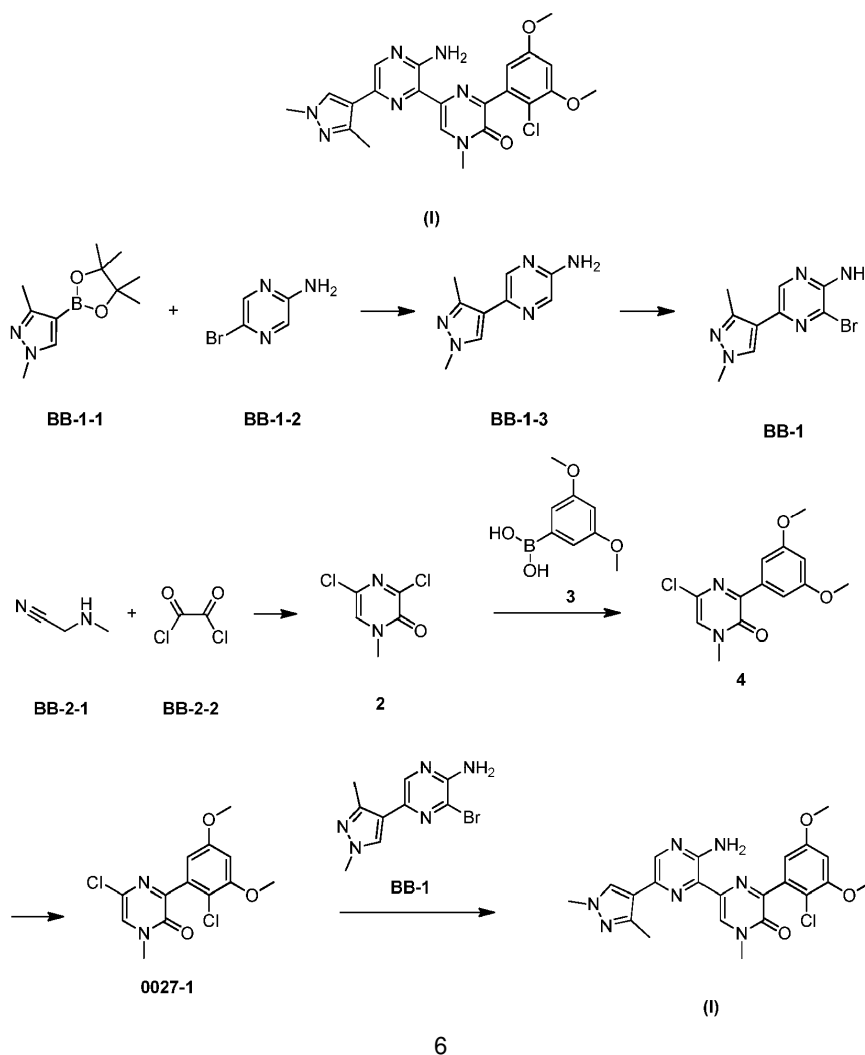
La figura 5 es el patrón de DSC de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II).

La figura 6 es el patrón de TGA de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II).

15 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones no abarcadas por las reivindicaciones se proporcionan con fines de referencia.

Descripción detallada de la realización

La presente descripción se describe en detalle a continuación por medio de realizaciones, pero esto no implica ninguna limitación adversa de la descripción.

Realización 1: Preparación del compuesto de fórmula (I) y la sal de trifluoroacetato del mismo

Etapa 1: Síntesis del compuesto BB-1-3

5 El compuesto BB-1-2 (2,0 g, 11,49 mmol, 1 eq) y el compuesto BB-1-1 (2,6 g, 11,49 mmol, 1 eq) se disolvieron en agua (6,0 ml) y dioxano (25,0 ml), seguido de la adición de dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (841 mg, 1,15 mmol, 0,1 eq) y carbonato de potasio (4,8 g, 34,48 mmol, 3 eq), y la mezcla se calentó a 100 °C y se hizo reaccionar durante 16 horas bajo la protección de nitrógeno. La mezcla de reacción obtenida se filtró a presión reducida y se evaporó a sequedad por evaporación rotatoria, y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:0 a 0:1) para obtener el compuesto BB-1-3. MS (ESI) m/z: 190,0 [M+H]⁺.

Etapa 2: Síntesis del compuesto BB-1

10 El compuesto BB-1-3 (0,5 g, 2,64 mmol, 1 eq) y la piridina (209 mg, 2,64 mmol, 213,28 µl, 1 eq) se añadieron al cloroformo (20,0 ml) y la mezcla se enfrió a 0 °C, y luego se le añadió bromo (422 mg, 2,64 mmol, 136,22 µl, 1 eq). La reacción se llevó a cabo a la temperatura ambiente de 28 °C durante 18 horas. La reacción se inactivó con tiosulfato de sodio (1,0 ml), luego se filtró a presión reducida, el filtrado se concentró y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice ultrarrápida (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:0 a 1:1). Se obtuvo el compuesto BB-1. MS (ESI) m/z: 267,9 [M+H]⁺.

15 RMN ¹H (400 MHz, CD₃DO) δ: 8,12 (s, 1 H), 7,90 (s, 1 H), 3,86 (s, 3 H), 2,43 (s, 3 H).

Etapa 3: Síntesis del compuesto 2

20 Bajo la protección de nitrógeno, el compuesto BB-2-1 (2,0 g, 18,77 mmol, 2,17 ml, 1 eq, HCl) se disolvió en clorobenceno (15,0 ml), y luego se le añadió el compuesto BB-2-2 (8,3 g, 65,69 mmol, 5,8 ml, 3,5 eq) gota a gota a 25 °C; la mezcla se calentó lentamente a 90 °C y se agitó durante 16 horas. Se le agregaron agua (30,0 ml) y acetato de etilo (30,0 ml) al sistema de reacción, la mezcla se dejó reposar, luego se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo tres veces con acetato de etilo (20,0 ml, 20,0 ml, 20,0 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron una vez con solución saturada de cloruro de sodio (30,0 ml) y finalmente se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se separó el producto bruto y se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:0 a 2:1) para obtener el compuesto 2. MS (ESI) m/z: 178,7 [M+1]⁺.

25 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,26 (s, 1H), 3,61 (s, 3H).

Etapa 4: Síntesis del compuesto 4

30 El compuesto 2 (0,2 g, 1,12 mmol, 1 eq) y el compuesto 3 (213 mg, 1,17 mmol, 1,05 eq) se disolvieron en una solución mixta de dioxano (1,5 ml) y agua (1,5 ml) en un tubo de microondas bajo la protección de nitrógeno, se le añadieron tetrakis(trifenilfosfina)paladio (65 mg, 55,86 µmol, 0,05 eq) y carbonato de sodio (130 mg, 1,23 mmol, 1,1 eq), y la mezcla se agitó a 120 °C durante 30 minutos con radiación de microondas. La mezcla de reacción se concentró directamente. El producto bruto se separó por cromatografía en columna (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:0 a 0:1) (detección por TLC con éter de petróleo:acetato de etilo = 1:1) para obtener el compuesto 4. MS (ESI) m/z: 281,0 [M+1]⁺.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,64 (d, 2H), 7,28 (s, 1H), 6,59 (t, 1H), 3,86 (s, 6H), 3,61 (s, 3H).

Etapa 5: Síntesis del compuesto 0027-1

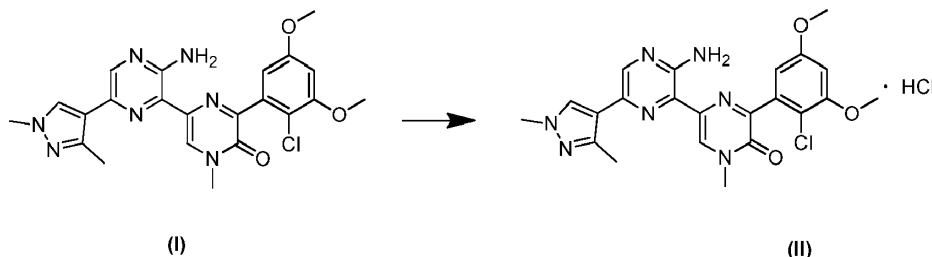
40 El compuesto 4 (250 mg, 890,61 µmol, 1 eq) se disolvió en una solución mixta de acetonitrilo (20,0 ml) y diclorometano (5,0 ml) bajo la protección de nitrógeno; se le añadió una solución de cloruro de sulfonilo (84 mg, 623,43 µmol, 62,33 µl, 0,7 eq) en acetonitrilo (2,5 ml) lentamente, gota a gota, a 0 °C y la mezcla se agitó a 0 °C durante 10 minutos. La reacción se inactivó añadiendo metanol (5,0 ml) a la mezcla de reacción y luego la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El producto bruto se separó por cromatografía en columna (éter de petróleo:acetato de etilo = 1:0 a 1:1) (detección por TLC en éter de petróleo:acetato de etilo = 1:1) para obtener el compuesto 0027-1. MS (ESI) m/z: 314,9 [M+H]⁺.

Etapa 6: Síntesis del compuesto de fórmula (I)

45 En un matraz de tres bocas, el compuesto 0027-1 (59 mg, 186,49 µmol, 1 eq), bis(pinacolato)diboro (52 mg, 205,14 µmol, 1,1 eq), acetato de paladio (5 mg, 20,51 µmol, 0,11 eq), 2-diciclohexilfosfino-2,4,6-triisopropilbifenilo (20 mg, 41,03 µmol, 0,22 eq) y acetato de potasio (60 mg, 615,42 µmol, 3,3 eq) se añadieron a una solución de dioxano (4,0 ml); el aire del sistema de reacción se reemplazó por nitrógeno; bajo saturación de nitrógeno, el sistema de reacción se elevó a 100 °C y se agitó con reflujo durante 30 min, se enfrió a 25 °C, luego se le añadieron el compuesto BB-1 (50 mg, 186,49 µmol, 1 eq), el complejo de diclorometano de dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (15 mg, 18,65 µmol, 0,1 eq), carbonato de potasio (77 mg, 559,47 µmol, 3 eq), dioxano (4,0 ml) y agua (2,0 ml); el aire del sistema de reacción se reemplazó por nitrógeno; bajo saturación de nitrógeno, la temperatura se elevó a 100 °C y la mezcla se agitó con reflujo durante 8 horas. La mezcla de reacción se concentró directamente. Se separó el producto bruto obtenido y se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (columna cromatográfica: Boston Green ODS 150 × 30 mm 5 µm; fase móvil: [agua (0,1 % TFA)-ACN]; B %: 30 % a 60 %, 8 min), y se obtuvo la sal de trifluoroacetato

del compuesto de fórmula (I). MS (ESI) m/z : 468,2 $[M+H]^+$. RMN 1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 8,79 (s, 1H), 8,09 (m, 2H), 6,76 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 2,54 (s, 3H). La sal se disolvió en diclorometano y la mezcla se lavó con carbonato de sodio saturado; la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad mediante evaporación rotatoria para obtener el compuesto de fórmula (I). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,51 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,71 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 6,63 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 6,43 (brs, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 2,55 (s, 3H).

Realización 2: Preparación del compuesto de fórmula (II)



El compuesto de fórmula (I) (44,4 g, 94,89 mmol, 1 *eq*) se disolvió en tetrahidrofurano (450 ml), seguido de la adición gota a gota de una solución de cloruro de hidrógeno (4 M, 94,89 ml, 4 *eq*) en acetato de etilo y la mezcla se agitó a 25 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró para obtener un sólido amarillo, que se secó con una bomba de aceite. Se obtuvo el compuesto de fórmula (II).

RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8,71 (s, 1H), 8,18 (s, 2H), 6,82 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 2,44 (s, 3H).

Realización 3: Preparación de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (II)

Se pesaron 400 mg del compuesto de fórmula (II) y se colocaron en un matraz de vidrio de 40 ml, se le añadieron 20 ml de etanol, y luego la mezcla se agitó para formar una suspensión. La muestra se colocó en un agitador magnético (50 °C) y se agitó durante 60 horas (protegido de la luz). La muestra se centrifugó rápidamente y el sólido residual se colocó en un horno de secado al vacío, y se secó al vacío a 45 °C durante la noche para eliminar el solvente residual y obtener la forma cristalina A.

Realización 4: Preparación de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II)

Se pesaron 400 mg del compuesto de fórmula (II) y se colocaron en un matraz de vidrio de 40 ml, se le añadieron 20 ml de acetato de etilo, y luego la mezcla se agitó para formar una suspensión. La muestra se colocó en un agitador magnético (50 °C) y se agitó durante 60 horas (protegido de la luz). La muestra se centrifugó rápidamente y el sólido residual se colocó en un horno de secado al vacío, y se secó al vacío a 45 °C durante la noche para eliminar el solvente residual y obtener la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II).

Realización experimental 1: evaluación *in vitro* de la actividad inhibidora de la cinasa de tipo salvaje

Los valores de CI_{50} se midieron con la prueba de actividad cinasa marcada con el isótopo ^{33}P (Reaction Biology Corp) para evaluar la capacidad inhibidora de los compuestos analizados sobre los FGFR1 y FGFR4 humanos.

Condiciones del tampón: ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfónico a 20 mM (Hepes) (pH 7,5), $MgCl_2$ a 10 mM, ácido etilenglicol-bis-(éter 2-amino-etílico)tetraacético (EGTA) a 1 mM, 0,02 % de polioxietileno lauriléter (Brij35), 0,02 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,1 mM de vanadato de sodio (Na_3VO_4), ditiotreitól (DTT) a 2 mM, DMSO al 1%.

Etapas experimentales: a la temperatura ambiente, los compuestos analizados se disolvieron en DMSO para preparar una solución a 10 mM para su uso posterior. El sustrato se disolvió en el tampón recién preparado, se le añadió la cinasa problema y se mezcló bien la mezcla. La solución de DMSO disuelta con el compuesto problema se añadió a la mezcla de reacción anterior utilizando una técnica acústica (Echo 550). La concentración de los compuestos en la mezcla de reacción fue 10 μM , 3,33 μM , 1,11 μM , 0,370 μM , 0,123 μM , 41,2 nM, 13,7 nM, 4,57 nM, 1,52 nM, 0,508 nM o 10 μM , 2,50 μM , 0,62 μM , 0,156 μM , 39,1 nM, 9,8 nM, 2,4 nM, 0,61 nM, 0,15 nM, 0,038 nM. Después de 15 minutos de incubación, se le añadió ^{33}P -ATP (actividad de 0,01 $\mu Ci/\mu l$, las concentraciones correspondientes se recogen en la tabla 3) para iniciar la reacción. El número del proveedor, el número de lote y la información sobre la concentración en la mezcla de reacción de FGFR1, FGFR4 y sus sustratos se recogen en la tabla 3. Después de incubar la reacción de cinasa durante 120 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se depositó en papel de filtro de intercambio iónico P81 (Whatman # 3698-915). Después de lavar repetidamente el papel de filtro con una solución de ácido fosfórico al 0,75 %, se midió la radiactividad del sustrato fosforilado que quedaba en el papel de filtro. Los datos de actividad cinasa se expresaron mediante la comparación de la actividad cinasa del compuesto problema con la actividad cinasa del grupo de control (que solo contenía DMSO). El valor de CI_{50} se obtuvo ajustando la curva con el programa informático Prism4 (GraphPad). Los resultados experimentales se muestran en la tabla 4.

Tabla 3: Información relativa a la cinasa, el sustrato y el ATP en la prueba *in vitro*.

Cinasa	Proveedor	# Catálogo	# Lote	Concentración de ATP (μM)
FGFR1	Invitrogen	PV3146	28427Q	5
FGFR2	Invitrogen	PV3368	31517I	5
FGFR3	Invitrogen	PV3145	28459R	30
FGFR4	Invitrogen	P3054	26967J	2,5
Sustrato	Proveedor	# Catálogo	# Lote	Concentración de sustrato en la mezcla de reacción (μM)
pEY (mg/ml) + manganeso	Sigma	P7244-250MG	062K5104V	0,2
pEY (mg/ml) + manganeso	Sigma	P7244-250MG	062K5104V	0,2
pEY (mg/ml) + manganeso	Sigma	P7244-250MG	062K5104V	0,2
pEY (mg/ml) + manganeso	Sigma	P7244-250MG	062K5104V	0,2

Tabla 4: Resultados de las pruebas de cribado *in vitro* para los compuestos de la presente descripción

Compuesto	CI ₅₀ (nM)				Selectividad	
	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	FGFR1/2	FGFR1/3
La sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I)	2,12	0,53	0,69	106	4,02	3,06

- 5 Conclusión: La sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I) presenta una mejor actividad inhibidora contra el FGFR de tipo salvaje, y la selectividad por FGFR2 y 3 frente a FGFR1 y 4 fue mayor.

Realización experimental 2: evaluación farmacocinética de compuestos

Propósitos experimentales: analizar la farmacocinética del compuesto en los ratones

Materiales experimentales:

- 10 Ratones CD-1 (macho), vehículo (solución acuosa con metilcelulosa al 0,5 % (p/v) y Tween 80 al 0,5 % (v/v)), sal de trifluoroacetato del compuesto 0027.

1. Preparación de la formulación para la administración:

El vehículo era una solución acuosa de Tween 80 al 0,5 % (v/v) y metilcelulosa al 0,5 % (p/v), y se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 15 a. Se añadió alrededor del 50 % del volumen de agua pura en un recipiente adecuado y se calentó a aproximadamente 60 °C a 70 °C.
- b. Cuando la temperatura del agua alcanzó el margen de valores especificado, se apagó el calentador. La cantidad necesaria de metilcelulosa se añadió lentamente al recipiente y la mezcla se agitó continuamente.
- 20 c. La mezcla se agitó continuamente a 4 °C hasta que la mezcla se volvió transparente a simple vista.
- d. Se añadió el volumen necesario de Tween 80 a la solución anterior. La mezcla se agitó continuamente hasta que el Tween 80 se dispersó y se volvió transparente a simple vista.

- e. La solución anterior se ajustó al volumen final con una cantidad apropiada de agua pura.
- f. La mezcla se agitó continuamente hasta que se formó una solución homogénea.

Preparación de formulación para la administración intragástrica:

- a. se pesó una cantidad apropiada del producto problema en un matraz de vidrio;
- 5 b. se le añadió un 70 % del volumen de vehículo (solución acuosa de metilcelulosa al 0,5 % (p/v) y Tween 80 al 0,5 % (v/v));
- c. la formulación se agitó hasta que quedó homogénea a simple vista, con sonicación en baño de agua cuando fue necesario;
- 10 d. se complementó el volumen restante de metilcelulosa al 0,5 % y Tween 80 al 0,5 %, y la mezcla se agitó uniformemente.

2. Administración

A los animales de los grupos 1 y 2 se les administraron 5 mg/ml y 30 mg/ml del compuesto mediante una única administración intragástrica, respectivamente, con un volumen de dosis de 10 ml/kg.

15 Los animales se pesaron antes de la administración y el volumen de administración se calculó de acuerdo con el peso corporal.

3. Recolección y procesamiento de las muestras

20 Se recogieron muestras de sangre completa (30 μ l) en tiempos concretos (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 horas) por extracción desde la vena safena y se anotó la hora de recolección en el registro de la prueba. El error aceptable para los puntos de tiempo de recolección fue de ± 1 minuto para los puntos temporales en el plazo de 1 hora desde la administración y de ± 5 % del tiempo teórico para otros puntos temporales.

25 Todas las muestras de sangre se transfirieron inmediatamente a tubos de centrifuga comerciales etiquetados que contenían K2-EDTA. Después de recolectar las muestras de sangre, estas se centrifugaron a 4 °C y 3200 rpm durante 10 minutos, y se aspiró el plasma sobrenadante y luego se colocó rápidamente en hielo seco a una temperatura de -20 °C o menos para el análisis por LC-MS. Y se calcularon los parámetros farmacocinéticos y resultado experimental: véase la tabla 5.

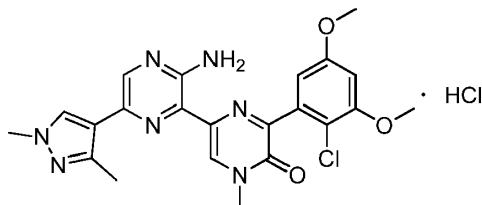
Tabla 5 Resultados de la prueba farmacocinética

Compuesto	La sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I)	
	50 mpk	300 mpk
Parámetro\dosificación	50 mpk	300 mpk
C _{máx} (nM)	14 800	42 100
T _{máx} (horas)	1,00	7,00
T _{1/2} (horas)	2,46	ND
T _{último} (horas)	ND	24,0
ABC _{0-último} (nM.h)	85 826	699 413
ABC _{0-inf} (nM.h)	95 847	ND
MRT _{0-último} (h)	4,33	11,1
MRT _{0-inf} (h)	5,39	ND
ND se refiere a: indeterminado		

Conclusión: El índice farmacocinético de la sal de trifluoroacetato del compuesto de fórmula (I) en los ratones es bueno.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A de un compuesto de fórmula (II), en la que su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,99 \pm 0,20^\circ$, $9,54 \pm 0,20^\circ$, y $10,45 \pm 0,20^\circ$,



(II)

5

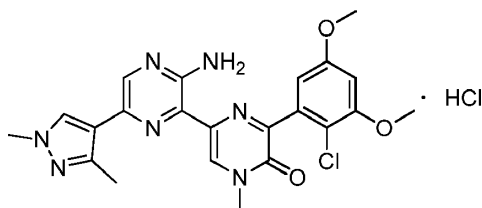
2. La forma cristalina A según se define en la reivindicación 1, en la que su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,99 \pm 0,20^\circ$, $5,85 \pm 0,20^\circ$, $9,54 \pm 0,20^\circ$, $10,45 \pm 0,20^\circ$, $11,45 \pm 0,20^\circ$, $13,19 \pm 0,20^\circ$, $15,93 \pm 0,20^\circ$ y $19,48 \pm 0,20^\circ$.

10 3. La forma cristalina A según se define en la reivindicación 2, en la que su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,99^\circ$, $5,85^\circ$, $9,54^\circ$, $9,94^\circ$, $10,45^\circ$, $11,45^\circ$, $13,19^\circ$, $13,92^\circ$, $14,51^\circ$, $15,11^\circ$, $15,93^\circ$, $16,86^\circ$, $17,94^\circ$, $19,48^\circ$, $19,90^\circ$, $20,80^\circ$, $21,60^\circ$, $21,97^\circ$, $23,28^\circ$, $23,66^\circ$, $25,52^\circ$, $26,19^\circ$, $27,47^\circ$, $28,66^\circ$, $29,03^\circ$ y $29,42^\circ$.

15 4. La forma cristalina A según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que su curva de calorimetría diferencial de barrido, medida a una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, tiene un pico endotérmico con un inicio a $201,7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y tiene un pico endotérmico con un inicio a $254,8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

20 5. La forma cristalina A según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que su curva de análisis termogravimétrico, medida a una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, muestra una pérdida de peso del $0,5876 \%$ a $63,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, se produjo una pérdida de peso del $2,4156 \%$ a $127,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, se produjo una pérdida de peso del $8,8666 \%$ a $209,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y se produjo una pérdida de peso del $11,8416 \%$ a $263,2 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

6. Una forma cristalina B del compuesto de fórmula (II), en la que su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $10,57 \pm 0,20^\circ$, $14,59 \pm 0,20^\circ$, y $16,05 \pm 0,20^\circ$,



(II)

25 7. La forma cristalina B según se define en la reivindicación 6, en la que su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,60 \pm 0,20^\circ$, $10,57 \pm 0,20^\circ$, $13,82 \pm 0,20^\circ$, $14,59 \pm 0,20^\circ$, $16,05 \pm 0,20^\circ$, $19,52 \pm 0,20^\circ$, $21,45 \pm 0,20^\circ$ y $27,16 \pm 0,20^\circ$.

30 8. La forma cristalina B según se define en la reivindicación 7, en la que su patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ , medidos a una longitud de onda $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$: $4,60^\circ$, $5,87^\circ$, $9,06^\circ$, $9,54^\circ$, $10,57^\circ$, $11,42^\circ$, $13,21^\circ$, $13,82^\circ$, $14,59^\circ$, $16,05^\circ$, $17,23^\circ$, $18,16^\circ$, $19,52^\circ$, $20,12^\circ$, $20,22^\circ$, $21,45^\circ$, $22,00^\circ$, $22,95^\circ$, $23,61^\circ$, $24,06^\circ$, $24,61^\circ$, $25,85^\circ$, $26,29^\circ$, $27,16^\circ$, $28,44^\circ$, $28,68^\circ$, $30,94^\circ$, $32,07^\circ$, $32,40^\circ$, $33,01^\circ$, $33,94^\circ$, $34,82^\circ$, $35,64^\circ$, $36,95^\circ$ y $38,88^\circ$.

35 9. La forma cristalina B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que su curva de calorimetría diferencial de barrido, medida a una velocidad de calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, tiene un pico endotérmico con un inicio a $224,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y tiene un pico endotérmico con un inicio a $257,4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

10. La forma cristalina B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que su curva de análisis termogravimétrico, medida a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, muestra una pérdida de peso del 0,1558 % a $90,9\text{ °C} \pm 3,0\text{ °C}$, se produjo una pérdida de peso del 6,6758 % a $206,5\text{ °C} \pm 3,0\text{ °C}$ y se produjo una pérdida de peso del 9,4648 % a $255,9\text{ °C} \pm 3,0\text{ °C}$.

5

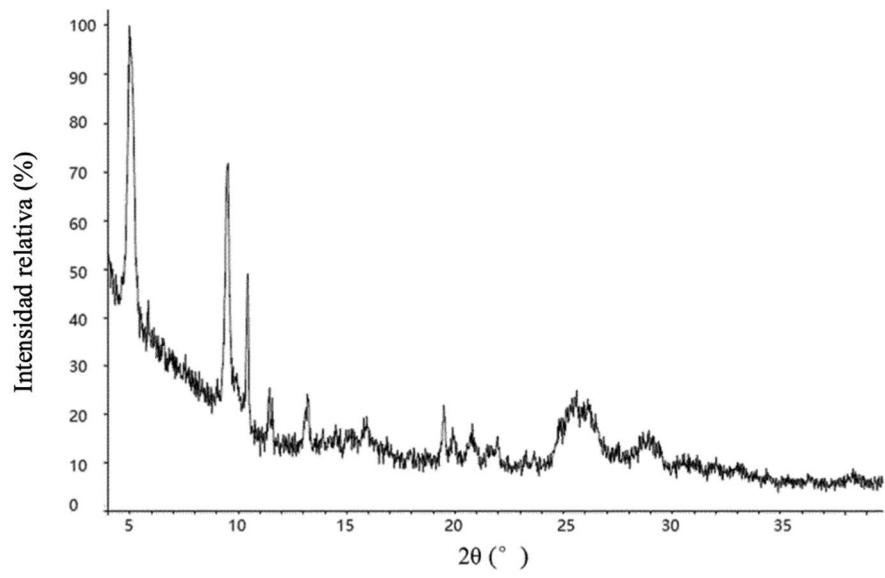


Fig. 1

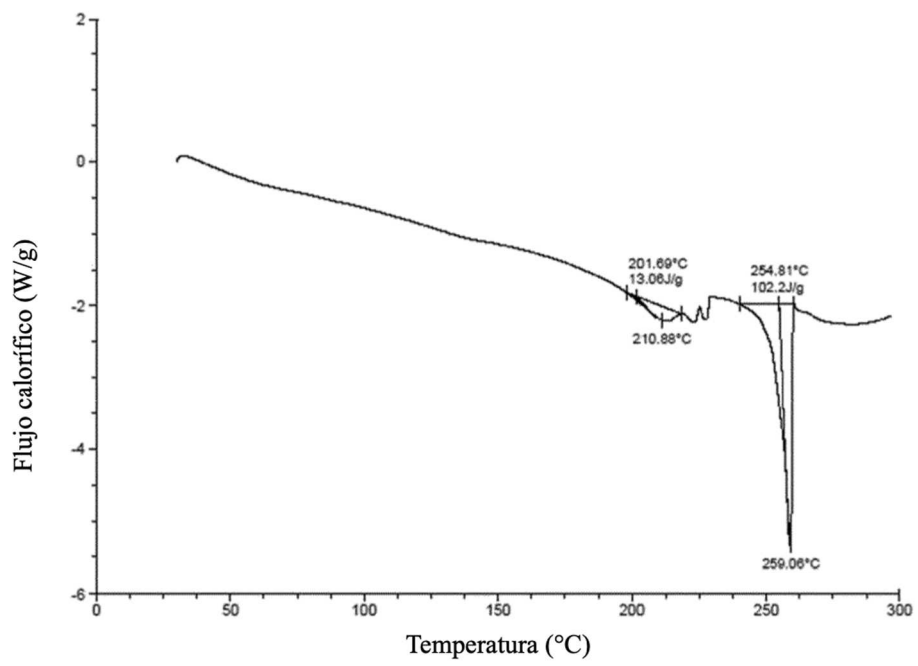


Fig. 2

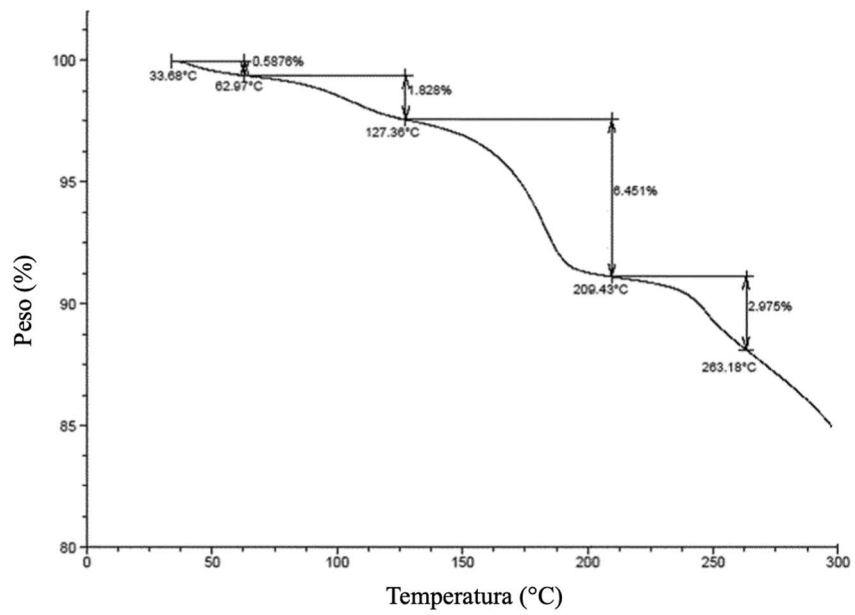


Fig. 3

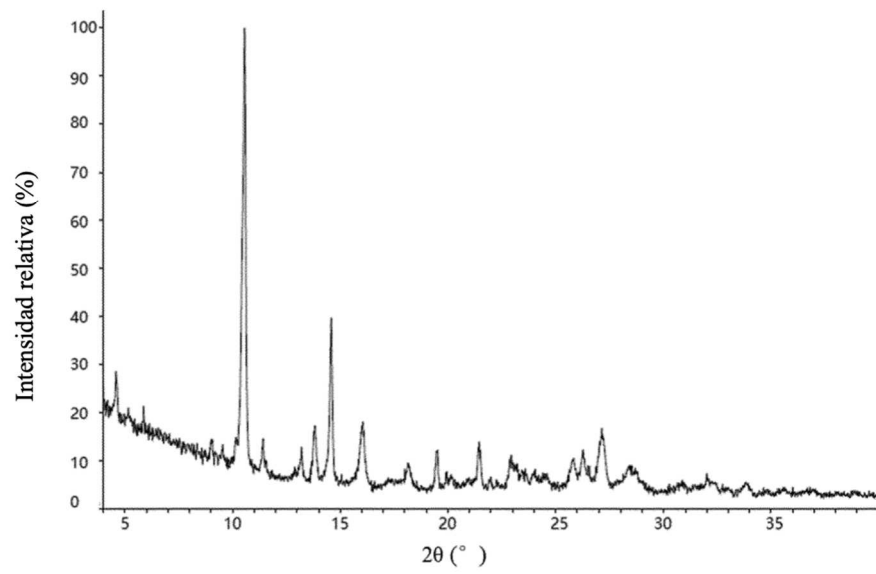


Fig. 4

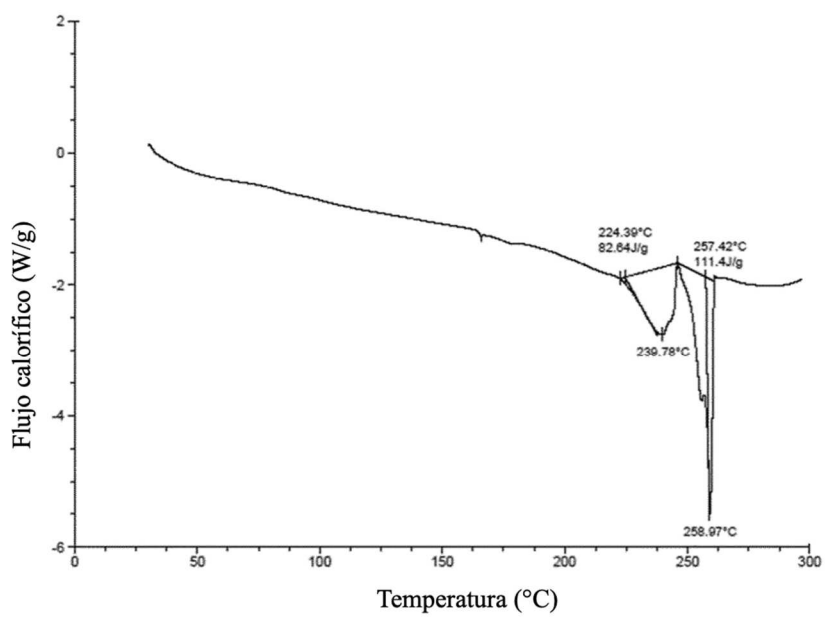


Fig. 5

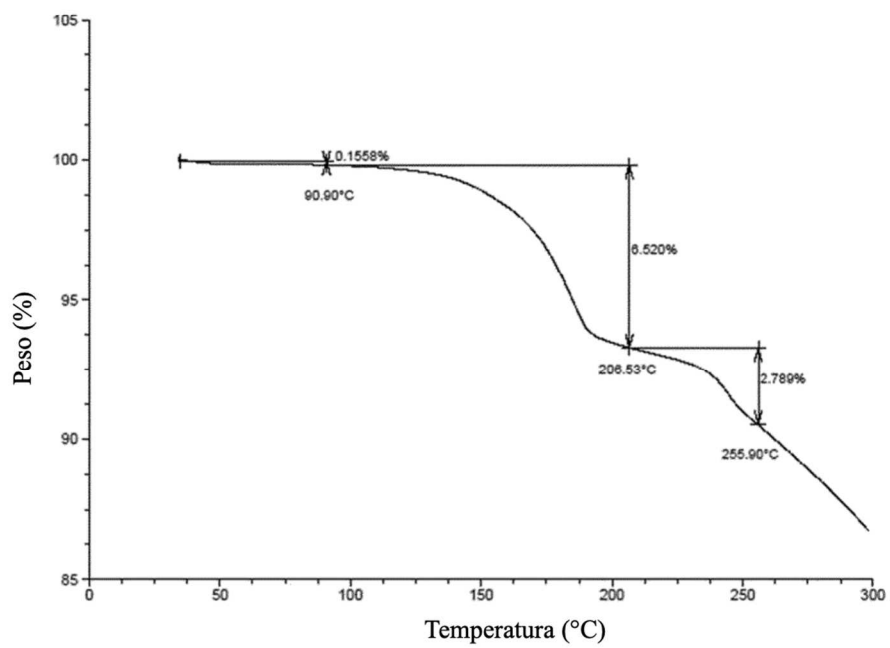


Fig. 6