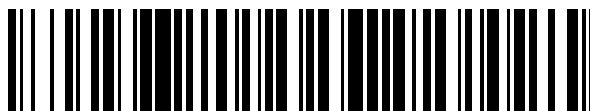


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 425**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4162 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006 E 06774280 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 1910370**

54 Título: **Pirrolo[1,2-b]pirazol piridinoquinoleino sustituido monohidrato como inhibidor del TBF-beta**

30 Prioridad:

22.07.2005 US 701641 P

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

05.08.2015

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

MUNDLA, SREENIVASA, REDDY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 542 425 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).

DESCRIPCION

Pirrolo[1,2-b]pirazol piridinoquinoleino sustituido monohidrato como inhibidor del TGF-beta

Antecedentes de la invención

El factor de crecimiento transformante (TGF- β) es un prototipo para una gran familia de factores de crecimiento y diferenciación que regulan el desarrollo. Los miembros de la familia del TGF- β activan quinasas receptoras de serina/treonina transmembrana, iniciando, de esta forma, una cascada de señales vía Smads, una nueva clase de efectores de señales intracelulares que regulan la expresión del gen. El TGF- β es un potente inductor de la interrupción del crecimiento en muchos tipos de células, incluyendo las células epiteliales. Esta actividad es la base del papel supresor de tumores del sistema de señales del TGF- β en carcinomas. Otras actividades, incluyendo la diferenciación epitelial a mesenquimal inducida por TGF- β , contribuyen a la progresión del cáncer.

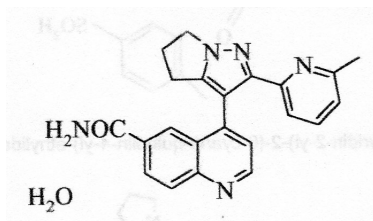
La familia de señales del TGF- β es de especial relevancia en la diferenciación mesenquimal, incluyendo el desarrollo óseo. La expresión desregulada o activación de componentes de este sistema de señales puede contribuir a enfermedades esqueléticas, por ejemplo osteoartritis. Véase Wakefield, y otros, *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 12, págs. 22-29, (2002); Siegel, y otros, *Nature Reviews (Cancer)*, vol. 3, págs. 807-820, (2003); Dumont, y otros, *Cancer Cell*, vol. 3, págs. 531-536, (2003).

La Solicitud de Patente PCT WO 02/0948332 describe un género de compuestos dihidropirrolpirazol útiles para el tratamiento de trastornos asociados con actividad de señales del TGF- β potenciada o de sobreproducción. La Solicitud de Patente PCT WO 2004/048382 describe una forma anhidra de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol.

De manera sorprendente, se ha descubierto que el 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol puede prepararse en una forma de monohidrato cristalino que tiene propiedades ventajosas, con relación a la forma anhidra, de propiedades de manipulación en sólido superiores sobre una base a gran escala, facilidad de purificación mediante cristalización, y estabilidad termodinámica bajo condiciones de procesamiento farmacéutico y almacenamiento. Igualmente, se ha descubierto un procedimiento de fabricación para la nueva forma.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monohidrato, es decir, Fórmula I



Fórmula I,

en una forma cristalina.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monohidrato y un excipiente, diluyente o vehículo aceptable farmacéuticamente.

La presente invención se refiere a un procedimiento de inhibición de la señal del TGF- β en un mamífero, que comprende la administración a un mamífero que necesite de dicho tratamiento, de una cantidad eficaz de una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monohidrato.

La presente invención se refiere además a un procedimiento de tratamiento estados resultantes de una producción excesiva del TGF- β en un mamífero, que comprende la administración a un mamífero que necesite de dicho tratamiento, de una cantidad supresora de la señal del TGF- β de una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monohidrato.

Dado que los compuestos de la presente invención son inhibidores de la señal del TGF- β , los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de diversidad de trastornos que incluyen el tratamiento de neoplasmas susceptibles.

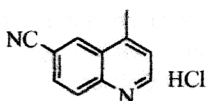
En uno de sus aspectos del procedimiento, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de neoplasmas susceptibles que comprende la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad de una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monohidrato.

La presente invención proporciona una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato para uso en terapia. La presente invención se refiere al uso de una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos asociados con actividad de señal de del TGF- β potenciada o de sobreproducción.

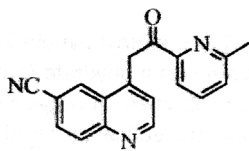
En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de una forma cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato.

Descripción detallada de la invención

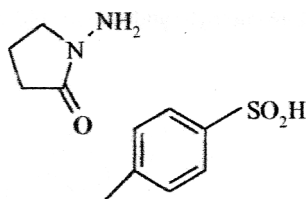
Tal como se usa en la presente invención, el término “hidrocloruro de 6-ciano-4-metil-quinoleina”, se refiere a



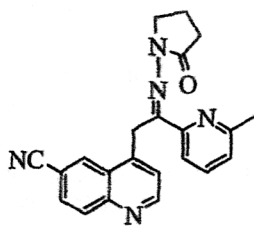
El término “2-(6-ciano-quinolein-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona”, se refiere a



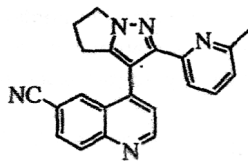
El término “p-tolueno sulfonato de 1-(amino)-2-pirrolidinona”, se refiere a



El término “1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolein-4-il)-etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona”, se refiere a



El término “3-(6-ciano-quinolein-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol”, se refiere a



El término “cantidad eficaz” de un compuesto de la presente invención, se refiere a una cantidad, es decir, la dosificación a la cual es eficaz en el tratamiento de los trastornos descritos en la presente invención.

Una cantidad eficaz puede ser fácilmente determinada por el especialista que le atienda, tal como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas convencionales y mediante la observación de los resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de una cantidad eficaz, la dosis de un compuesto de la presente in-

vención, se consideran un cierto número de factores por el especialista que le atienda, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, el compuesto de la presente invención a administrar; la co-administración de otras terapias, en caso de usarse; las especies de mamífero; su tamaño, edad, y estado de salud general; el trastorno específico implicado; el grado de complicación o la severidad del trastorno; la respuesta del paciente individual; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de otra medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención se espera que sea la suministrada, una vez al día o dos veces al día, a 10 mg hasta 1 g de dosis diaria total, preferiblemente desde 100-200 mg, preferida una dosis baja. Una dosis eficaz podría ser igualmente una dosificación de una vez al día o una vez a la semana con formulaciones de liberación sostenida. Las cantidades más preferidas pueden ser determinadas por un experto en la técnica.

Se da por entendido que el TGF- β incluye tanto el TGF- β 1 como el TGF- β 2.

Las condiciones "caracterizadas por actividad del TGF- β potenciada" incluyen aquellas en las que la síntesis del TGF- β está estimulada de manera tal que el TGF- β está presente en índices incrementados o en las que la proteína latente del TGF- β está de manera no deseada activada o convertida en proteína del TGF- β activa o en las que los receptores del TGF- β están sobre-regulados o en las que la proteína del TGF- β muestra unión potenciada a células o a matrix extracelular en la localización de la enfermedad. De acuerdo con ello, en cualquier caso, la "actividad potenciada" se refiere a cualquier estado en el que la actividad biológica del TGF- β es de manera no deseada alta, independientemente de la causa.

Existen diversos tipos de cáncer, es decir, neoplasmas susceptibles, en los que el TGF- β 1 producido por el tumor puede ser perjudicial. Estos incluyen cáncer de próstata (por ejemplo, Steiner y Barrack, *Mol. Endocrinol.*, vol. 6, págs. 15-25, (1992)), cáncer colorectal (por ejemplo, Neurath, y otros, *Immunity*, vol. 21, págs. 491-501, (2004)), cáncer de mama (por ejemplo, Arteaga, y otros, *Cell Growth and Differ*, vol. 4, págs. 193-201, (1993)), cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, Ready, y otros, *Semin. Oncol.*, vol. 32, (Supl. 3), págs. S35-41, (Aprl. 2005), cáncer de ovarios (por ejemplo, Dr. Gustavo C. Rodriguez, *32nd Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists*, Nashville, TN, (March 2-7, 2001)), cáncer endometrial (por ejemplo, Dowdy, y otros, *Gynecol. Oncol.*, vol. 96, (nº 2), págs. 368-73, (Feb. 2005)), cáncer testicular (por ejemplo, Morera, y otros, *Endocrinology*, vol. 130, págs. 831-836, (1992)), osteosarcoma (por ejemplo, Kloen, y otros *Int. J. Cancer*, vol 58, (nº 3), págs. 440-5, (Aug. 1, 1994)), y mieloma múltiple (por ejemplo, Cook, y otros, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 66, Ed. 6, págs. 981-988, (1999)). Véase, igualmente, Solicitud de Patente PTC WO 02/0948332.

Otra realización de la presente invención es la forma monohidrato cristalina de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amidoquinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol. El compuesto ha sido caracterizado tal como se describe a continuación.

Difracción de polvos por rayos X

El patrón de difracción de polvos por rayos X (XRD) del monohidrato cristalino se obtuvo sobre un difractómetro de polvos por rayos X Siemens D5000, equipado con una fuente CuK α (λ = 1,54056 Å) y un detector Si(Li) de estado sólido KeveX, operando a 50 KV y 40 mA. Cada muestra se escaneó entre 3 y 40 en 2θ , con un tiempo de intervalo de 0,02" en 2θ y una frecuencia de escaneo de 9,0 segundos/intervalo, y con rendijas de divergencia y recepción de 1 mm y un rendija detectora de 0,1 mm. El polvo seco se empaquetó dentro de portamuestras de carga superior empotrado y se obtuvo una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. El patrón de difracción de la forma cristal monohidrato, obtenido a temperatura y humedad relativa ambiente, se ajustó en base al pico patrón NIST 675 a 8,85 grados 2-teta.

Tabla 1

Angulo (+/-0,01 grados)	Espaciamento d
9,05	9,76
10,25	8,63
11,02	8,02
11,95	7,40
12,37	7,15
13,49	6,56

Tabla 1 (Cont.)

Angulo (+/-0,01 grados)	Espaciamiento d
14,84	5,96
17,48	5,07
20,11	4,41
20,77	4,27
24,13	3,69
25,38	3,51
26,00	3,42
26,73	3,33
28,79	3,10
29,91	2,98
31,84	2,81

De acuerdo con ello, una muestra adecuadamente preparada de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato puede caracterizarse mediante un patrón de difracción por rayos X usando radiación $\text{CuK}\alpha$ que tenga picos de difracción (valores 2-teta) tal como se describen en la Tabla 1, y en particular, que tenga picos a 9,95 en combinación con uno o más de los picos a 11,02, 11,95, y 14,84; y más particularmente que tenga un pico a 9,05; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,1 grados, más preferiblemente 0,01 grados.

Espectroscopía de RMN- ^{13}C de estado sólido

Los espectros de RMN de polarización cruzada/rotación de ángulo mágico (CP/MAS) de ^{13}C (RMN de estado sólido o SSNMR) se obtuvieron para el monohidrato cristalino usando un espectrómetro de RMN Varian Unity Inova de 400 MHz operando a una frecuencia de carbono de 100,573 MHz y equipado con un accesorio de sólidos completo y una sonda Chemagnetics de 4,0 mm T3. Se usaron la polarización cruzada de amplitud en rampa (RAMP-CP) a 62 kHz y desacoplamiento mediante modulación de fase de dos impulso (TPPM) a 70 kHz. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: amplitud de impulso de radiofrecuencia de protón 90° 4,0 μs , tiempo de contacto 2,0 ms, tiempo de repetición del impulso 60 s, frecuencia MAS 10 kHz, amplitud del espectro 50 kHz, y tiempo de adquisición 50 ms. Los desplazamientos químicos se referenciaron al grupo metilo del hexametilbenceno ($\delta = 17,3$ ppm) mediante sustitución de la muestra.

Desplazamientos químicos de ^{13}C de la forma cristal monohidrato: 20,5, 22,5, 26,3, 48,7, 108,8, 115,6, 122,6, 127,9, 128,8, 130,5, 136,4, 146,8, 149,0, 151,3, 152,0, 153,2, 157,9, y 171,0 (+/-0,2) ppm.

De acuerdo con ello, el 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino puede caracterizarse mediante resonancia magnética nuclear ^{13}C de estado sólido que tenga desplazamiento químico (ppm) de 108,8, 115,6, 122,6, y 171,0 (+/-0,2) ppm.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolwin-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato que comprende la cristalización de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol a partir de un disolvente apropiado conteniendo una relación de disolvente orgánico a agua de 0-90% bajo condiciones que proporcionen 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato.

El 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato puede prepararse mediante cristalización bajo condiciones controladas. En particular, el monohidrato de la presente invención puede prepararse mediante cristalización a partir de un disolvente acuoso. Un disolvente acuoso es aquel que tiene una relación de disolvente orgánico a agua de 0-90% de disolvente orgánico. La preferida es una relación de disolvente orgánico a agua de entre 60:40 a 85:15. Más preferida, es una relación de disolvente orgánico a agua de 75:25. Los disolventes orgánicos preferidos son acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano (THF), metil etil cetona, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil formamida (DMF), N,N-dimetil acetamida, y N-metil pirrolidinona. En la práctica, se ha encontrado que la acetona es la más preferida. Después de suspender el 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol anhidro, monohidratado, o parcialmente hidratado, en un disolvente adecuado, la mezcla se agita a 20 a 100°C , preferiblemente a 60°C . Para disolventes de bajo punto de ebullición tal como acetoni-

trilo, acetona, y metil etil cetona, el volumen de la solución resultante se reduce, preferiblemente por destilación, a entre 35-70% del volumen inicial, preferiblemente 50%. Para disolventes de puntos de ebullición más altos, puede necesitarse una cantidad apropiada de adicional de agua a agregar para precipitar el producto. Durante la reducción, pueden agregarse cristales de siembra del monohidrato. La solución se enfría lentamente a 0-5°C, preferiblemente en dos fases, en las cuales la solución primeramente se enfría a 20-25°C durante 90 minutos, seguido de enfriamiento a 0-5°C durante 30-40 minutos. La suspensión se mantiene a 0-5°C durante un tiempo adicional de 30 minutos hasta 25 horas, preferiblemente 2-3 horas. La suspensión se filtra y el producto se lava, preferiblemente con agua o disolvente orgánico acuoso. El producto se seca, preferiblemente a 45°C.

En otra realización, puede prepararse 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato mediante la resuspensión del 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol en agua o DMSO acuoso.

El 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato puede prepararse mediante agitación en 10 volúmenes de disolvente orgánico en agua al 0-90% a temperatura ambiente durante 1-2 horas, filtración, y secado a 35-45°C, preferiblemente 45°C, bajo vacío. En los casos en que se use disolvente orgánico, la mezcla de reacción puede diluirse con agua (2-5 veces el volumen del disolvente orgánico usado) para mejorar la recuperación.

El 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino puede prepararse mediante una diversidad de procedimientos, algunos de los cuales se ilustran en los ejemplos más adelante. Se admite que un experto en la técnica pueda variar el orden de las etapas individuales en lo siguiente para proporcionar 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino.

Preparación 1:

Preparación de cristales de siembra de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato

A un matraz equipado con agitador mecánico se agregó 3-(6-ciano-quinolein-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol (500,2 g), carbonato potásico (39,4 g), y DMSO (3.000 ml) para formar una suspensión. En un matraz separado, se combinó peróxido de hidrógeno al 35% (154 ml) y agua desionizada (250 ml). La solución de peróxido de hidrógeno diluido se agregó a la suspensión anterior a lo largo de 30 a 45 minutos, de manera tal que la temperatura de reacción estaba dentro del intervalo de 22 a 34°C. Después de completar la adición, la mezcla de reacción se agitó hasta que la reacción se estimó que era completa, tal como se juzgó mediante HPLC.

Se preparó una solución de sulfito sódico (107,6 g) en agua desionizada (4.500 ml). La mezcla de reacción se agregó lentamente a la solución de sulfito sódico para interrumpir la solución de reacción, mientras se mantenía la temperatura desde 22 a 40°C. La mezcla de reacción se agitó durante 40-60 minutos y se agregó ácido HCl concentrado (37,5%) (450 ml). A la solución resultante se agregó carbón vegetal activado (56,4 g) y se agitó durante 10-15 minutos. La solución se filtró a través de tierra de diatomeas para eliminar el carbón vegetal activado. Al filtrado se agregó metanol (525 ml) y, a continuación, hidróxido sódico (1.700 ml) a lo largo de 35 minutos. La suspensión resultante se agitó durante una noche y se filtró.

La torta seca se suspendió en solución de acetonitrilo en agua al 66,75% (10.000 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo (~77 a 81°C) y se agitó durante 20 minutos. La mezcla se enfrió a 40°C y se agregó agua desionizada (2.500 ml) y, a continuación, se enfrió a 0-5°C y se agitó durante 2 a 3 horas. La suspensión se filtró y la torta se lavó con agua desionizada (500 ml). La torta se secó durante una noche a 40°C en una estufa de vacío, proporcionando 404,2 g de producto.

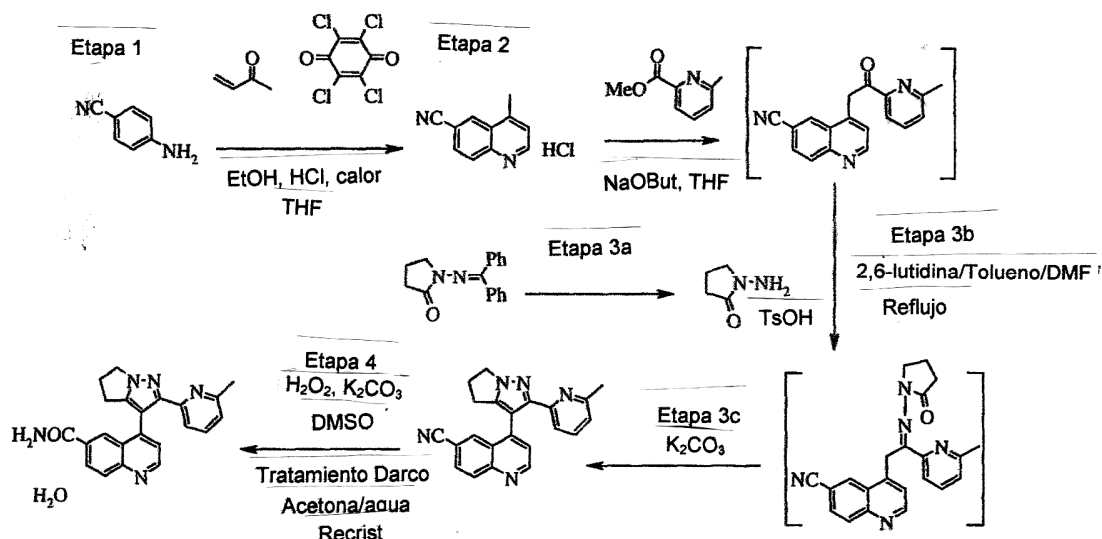
Preparación 2:

Preparación de cristales de siembra de 2-(6-ciano-quinolein-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona

A un matraz equipado con purga de N₂ y agitación por la parte superior, se cargó hidrócloruro de 6-ciano-6-metil quinoleina (10 g, 1 eav.) y THF (100 ml, 10 vol) y, a continuación, la mezcla se enfrió a 20-25°C. Se agregó NaOt-bu (15,497 g, 3,3 equiv.) en porciones a lo largo de 30 minutos para controlar la exotermia, manteniéndose la temperatura a <25°C. A continuación, se agregó una solución de metil-6-metil piridina-2-carboxilato (11,08 g, 1,5 equiv.) en THF (20 ml, 2 vol.), gota a gota, para mantener la temperatura entre 20°C y 25°C. La terminación de la reacción se monitorizó mediante análisis por HPLC (~2 horas). Una vez completada, la mezcla se enfrió por debajo de 15°C y se agregó HCl 1 N (70 ml). El pH se ajustó a 8,0-9,0 con NaOH 5 N (pH final a 8,8). Se agregó EtOAc (70 ml) y la capa acuosa se separó y la capa orgánica se lavó con cloruro sódico acuoso saturado (35 ml) y bicarbonato saturado (35 ml). La capa orgánica se concentró en vacío hasta ~5 volúmenes y se agregó lentamente MeOH (10 vol.) y, a continuación, se separaron por destilación 10 volúmenes y se volvió a agregar MeOH (10 vol.). La mezcla se enfrió a 5°C, se filtró y la torta se lavó con MeOH (5 vol.) y, a continuación, la torta se secó en vacío a 40°C, proporcionando 11,5 g de producto.

Ejemplo 1:

Preparación de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato



Etapa 1: Preparación de hidrocloruro de 6-ciano-4-metil-quinoleina

- 5 Se agregó etanol (EtOH) al 95% (270 l, 9 vol.) 4-aminobenzonitrilo (30,0 kg, 1 equiv.) y 2,3,5,6-tetracloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona (66,81 kg, 1,07 equiv.) a un matraz de reacción de 756 litros equipado con purga de nitrógeno, condensador, termopar, y agitación por la parte superior. Se agitó durante 2-5 minutos y, a continuación, se agregó ácido clorhídrico (HCl) concentrado (62,56 l, 3,0 equiv.) y, a continuación, se calentó a 75°C. Se diluyó con metil vinil cetona (33,06 l, 1,5 equiv.) en EtOH al 95% (30 l, 1 vol.) y, a continuación, se agregó lentamente a la mezcla de reacción a lo largo de 30 minutos. La terminación de la reacción se monitorizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se agregó tetrahidrofurano (THF) (11 vol., 330 l), a 75°C y, a continuación, se agitó durante 1 hora a 60°C. Se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora más. Se filtró sobre un filtro/secador agitado y, a continuación, se lavó con THF (240 l, 8 volúmenes). El secado durante una noche en vacío a 70°C, proporcionó el compuesto del epígrafe (42,9 kg, 82,55%).
- 10
- 15 RMN-¹H (DMSO d₆): δ = 9,047 ppm (d, 4,4 Hz, 1 H); 8,865 ppm (d, 1,6 Hz, 1H); 8,262 ppm (d, 8,8 Hz, 1H); 8,170 ppm (dd, 2,2 Hz, 8,8 Hz, 1H); 7,716 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 2,824 ppm (s, 3H); MS ES⁺: 169,1; Exact.: 168,07.

Etapa 2: Preparación de 2-(6-ciano-quinolein-4-il)1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona

- Se combinó 6-ciano-4-metil-quinoleina (28 kg) y THF (9,5 vol.) y se enfrió a 5°C. Se agregó t-butoxido sólido (3,3 equiv.) en porciones a la suspensión enfriada para mantener la temperatura del conjunto a ≤25°C. La mezcla resultante se agitó a 20°C durante 30 minutos. Un matraz separado se cargó con éster metílico de ácido 6-metil-2-piridinocarboxílico líquido (1,5 equiv.) y se diluyó con THF (2,0 vol.). La solución de éster metílico de ácido 6-metil-2-piridinocarboxílico se agregó lentamente (20-40 minutos) mientras se mantenía una temperatura de ≤25°C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a 20°C y se monitorizó mediante HPLC/TLC (cromatografía de capa fina sobre gel de sílice) para confirmar la terminación de la reacción. En un recipiente separado, se diluyó 1,03 kg de HCl concentrado por kg de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona con 7,7 volúmenes de agua. Tanto la mezcla de reacción como la solución de HCl se enfriaron a 5°C. Se realizó un ajuste de pH sobre la mezcla de reacción mediante la lenta adición de la solución de ácido, manteniendo la temperatura a <15°C. Se agregó solución ácida hasta que el pH de la mezcla era de 8,0-9,0. Después de obtener el punto final de pH, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (7 vol.). La capa orgánica se lavó con una solución de cloruro sódico/bicarbonato sódico acuoso [0,78 kg de cloruro sódico por kg de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona, y 0,20 kg de bicarbonato sódico (NaHCO₃) por kg de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona en 6,6 vol.]. La capa orgánica se destiló a 98 kPa para eliminar el THF y el acetato de etilo (EA) hasta que quedaron 5 volúmenes de solución concentrada. Se usó metanol (10 vol.) para llevar a cabo un intercambio de disolvente a metanol usando una operación de adición/destilación constante mientras se mantenía los 5 volúmenes. Se agregó metanol (MeOH) caliente (10 vol., aprox. 60°C). La solución se enfrió a 50°C y, a continuación, se agregaron cristales de siembra obtenidos mediante la Preparación 2. La mezcla se enfrió gradualmente a 5°C, se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta de producto se lavó con metanol enfriado (5 vol. aprox. 5°C) y se secó bajo vacío a 40°C hasta que se satisfizo una especificación de pérdida durante el secado (LOD) de <1%. Se obtuvo el compuesto del epígrafe (31,6 kg, 81%).
- 20
- 25
- 30
- 35

RMN-¹H (CDCl₃): δ = 8,978 ppm (d, 4,4 Hz, 1 H); 8,627 ppm (d, 1,6 Hz, 1H); 8,199 ppm (d, 8,8 Hz, 1H); 7,874 ppm (d, 7,7 Hz, 1H); 7,837 ppm (dd, 2,2 Hz, 8,8 Hz, 1H); 7,759 ppm (t, 7,7 Hz, 1H); 7,546 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 7,416 ppm (d, 7,7 Hz, 1H); 5,036 ppm (s, 2H); 2,720 ppm (s, 3H); MS ES+: 288,1; Exact.: 287,11.

Etapas 3a: Preparación de p-tolueno sulfonato de 1-(amino)-2-pirrolidinona

- 5 Se combinó 1-[(difenilmetileno)amino]-2-pirrolidinona (35,36 g, 134 mmol) con 15 volúmenes de tolueno (530 ml) en un matraz de reacción de 1 litro; se agregó 1 equivalente de agua (2,43 g, 134,9 mmol) y se calentó a 40°C. Se agregó 1 equivalente de ácido p-tolueno sulfónico monohidrato (25,978 g, 133,8 mmol). La reacción se monitorizó mediante TLC y, a continuación, se enfrió a 20-25°C. La suspensión se filtró y la torta se lavó con 3 volúmenes de tolueno (105 ml). Se secó hasta un peso constante en secador de vacío a 50°C, proporcionando el compuesto del epígrafe (36,14 g, 99,2%).

RMN-¹H (DMSO): δ = 7,472 ppm (dt, 8,2 Hz, 1,9 Hz, 2H); 7,112 ppm (m, 2H); 3,472 ppm (t, 7,0 Hz, 2H); 2,303 ppm (m, 5H); 2,012 ppm (m, 2H); MS: ES+: 179; 157. ES) 171; Exact.: 272,08.

Etapas 3b y 3c: Preparación de los compuestos intermedios 1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolein-4-il)-etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona y 3-(6-ciano-quinolein-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol

- 15 En un matraz de 1 litro, de 3 bocas, equipado con agitación mecánica, un condensador Dean-Stark, termopar y purga de N₂, se cargó 2-(6-ciano-quinolein-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona (25 g, 1 equiv.), p-tolueno sulfonato de 1-(amino)-3-pirrolidinona (27,3 g, 1 equiv.), dimetilformamida (DMF) (150 ml, 6 vol.), tolueno (250 ml, 10 vol.) y 2,6-lutidina (26 ml, 1 vol.). La mezcla se calentó a reflujo y periódicamente se eliminó agua procedente del separador. La reacción se monitorizó mediante análisis de HPLC o TLC (MeOH al 5%/cloruro de metileno, sílice). Después de 4
- 20 horas, la mayor parte de cetona se había convertido en 1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolein-4-il)-etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona, tal como se indicó mediante TLC.

- La mezcla de reacción se enfrió a 50 a 55°C y se cargó carbonato potásico (K₂CO₃) (20,42 g, 1,66 equiv.) dentro de la mezcla de reacción a lo largo de un par de minutos y la mezcla de reacción se volvió a calentar a reflujo. Se continuó eliminando el agua recogida en el separador y la reacción se monitorizó mediante HPLC, para determinar la
- 25 desaparición de la hidrazona. Una vez completada la reacción, se destiló la mayor parte del tolueno (se destiló un total de 350 ml) hasta que la mezcla de reacción alcanzó una temperatura de 145°C. La mezcla de reacción se enfrió a -30°C y se diluyó con agua (450 ml) y se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente (TA). El producto formado se filtró mediante filtración y la torta se lavó con 200 ml de agua. Después de 1 hora bajo vacío, se secó en una estufa de vacío a 70°C hasta un peso constante. El sólido seco pesó 28,5 g, con un rendimiento del 93,2% y la pureza determinada mediante HPLC fue del 97%. El producto se usó en la etapa siguiente.
- 30

RMN-¹H (CDCl₃): δ = 9,018 ppm (d, 4,5 Hz, 1 H); 8,233 ppm (d, 8,7 Hz, 1H); 8,198 ppm (dd, 0,5 Hz, 1,8 Hz, 1H); 7,808 ppm (dd, 1,8 Hz, 8,8 Hz, 1H); 7,483-7,444 ppm (m, 2H); 7,380 ppm (d, 7,9 Hz, 1H); 6,936 ppm (d, 7,6 Hz, 1H); 4,422 ppm (t, 7,2 Hz, 2H); 2,970-2,897 ppm (m, 2H); 2,776 ppm (p, 7,2 Hz, 2H); 2,065 ppm (s, 3H); MS ES+: 352,4; Exact.: 351,15.

- 35 Etapa 4: Preparación de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol, monohidrato

- Se formó una suspensión de 3-(6-ciano-quinolein-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol (25,515 kg) y carbonato potásico (0,2 equiv.) en 6 volúmenes de dimetil sulfoxido (DMSO). Se agregó solución de peróxido de hidrógeno diluido [peróxido de hidrógeno al 35% (1,25 equiv.) a 0,5 volúmenes de agua purificada] a la
- 40 suspensión a lo largo de 2-3 horas mientras se mantenía la temperatura entre 20-38°C. La reacción se monitorizó mediante HPLC (1 hora). Se agregó sulfito sódico (0,6 equiv.) a 9,1 volúmenes de agua purificada. La suspensión del producto se agregó a solución de sulfito sódico diluido [sulfito sódico (0,6 equiv.) en 9,1 volúmenes de agua purificada] mientras se mantenía la temperatura de 20-39°C; esta suspensión se agitó durante 1-2 horas para asegurar que todo el peróxido de hidrógeno remanente estaba completamente neutralizado. Se comprobó el peróxido. Se
- 45 agregaron 1,08 volúmenes de HCL Grado Alimentario al 32,1% a esta suspensión y se agitó durante 20-30 minutos. Se agregó carbón vegetal activado (10% en peso) a la solución y se agitó durante 20-40 minutos. El producto bruto se filtró (principalmente monohidrato), lavándose la torta con agua purificada. Se agregaron 1,05 volúmenes de metanol al filtrado. Se agregaron 5,5 volúmenes de hidróxido sódico 2 N al filtrado mientras se mantenía la temperatura de 20-30°C. La suspensión se agitó durante 20-30 minutos. Se confirmó que el pH era de >8.

- 50 La suspensión se filtró, y la torta se lavó con agua purificada. La torta húmeda se suspendió en 28 volúmenes de una solución de acetona/agua purificada, 75%/25%. Esta suspensión se calentó a reflujo (60°C) y se agitó durante 30-45 minutos después de disolverse el producto. La solución del producto se filtró. Se inició la destilación y, cuando la temperatura del calderín alcanzó los 63°C, se agregó la siembra molida. La destilación continuó hasta que el volumen destilado era el 50% del volumen inicial. La suspensión se enfrió a 20-25°C a lo largo de 90 minutos. A continuación, la suspensión se enfrió a 0-5°C a lo largo de 30-40 minutos. Se agitó durante 2-3 horas a 0-5°C. La suspensión se filtró y la torta del producto se lavó sobre el filtro con agua purificada. El producto se secó bajo vacío a 45°C, proporcionando el producto del epígrafe (25,4 kg, 90%). El contenido en agua, determinado mediante Karl
- 55 Fischer, fue del 4,6% en monohidrato. Teórico: 4,65%.

RMN-¹H (CDCl₃): δ = 9,0 ppm (d, 4,4 Hz, 1 H); 8,23-8,19 ppm (m, 2H); 8,315 ppm (dd, 1,9 Hz, 8,9 Hz, 1H); 7,455 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 7,364 ppm (t, 7,7 Hz, 1H); 7,086 ppm (d, 8,0 Hz, 1H); 6,969 ppm (d, 7,7 Hz, 1H); 6,022 ppm (m, 1H); 5,497 ppm (m, 1H); 4,419 ppm (t, 7,3 Hz, 2H); 2,999 ppm (m, 2H); 2,770 ppm (p, 7,2 Hz, 2H); 2,306 (s, 3H); 1,817 ppm (m, 2H). MS ES+: 370,2; Exact.: 369,16.

- 5 Como alternativa, el monohidrato de la presente invención puede prepararse mediante recristalización de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol.

Ejemplo 2:

2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato

- 10 Se suspendió 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol en 26 volúmenes de una solución de acetona/agua purificada, 75%/25%. Esta suspensión se calentó a reflujo (60°C) y se agitó durante 30-45 minutos después de que el producto se disolviera. La solución del producto se filtró. Se inició la destilación y, cuando la temperatura del calderín alcanzó los 63°C, se agregó la siembra molida. La destilación continuó hasta que el volumen destilado era el 50% del volumen inicial. La suspensión se enfrió a 20-25°C a lo largo de 90 minutos. A continuación, la suspensión se enfrió a 0-5°C a lo largo de 30-40 minutos. Se agitó durante 2-3 horas a 0-5°C. La suspensión se filtró y la torta del producto se lavó sobre el filtro con agua purificada. El producto se secó bajo vacío a 45°C, proporcionando el producto del epígrafe. La reacción proporcionó >80%. La pureza del producto fue >98% con bajo contenido total en sustancias relacionadas.

Como alternativa, el monohidrato de la presente invención puede prepararse mediante resuspensión de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol.

20 Ejemplo 3:

2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato

Se preparó 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monohidrato mediante agitación del compuesto o del ingrediente farmacéuticamente activo (API) en 10 volúmenes de agua a temperatura ambiente durante 1-2 horas, filtrándolo y secándolo a 45°C bajo vacío.

25 Purificación del receptor I del TGF-β1 y reacciones quinasa *in vitro*

Para receptores Tipo I del TGF-β1 (RIT204D):

El dominio quinasa citoplásmico marcado 6X-HIS de cada receptor se expresó y purificó a partir de lisados de célula de insecto Sf9 tal como se describe de forma resumida a continuación:

- 30 Los lisados de células se clarificaron mediante centrifugación y se filtraron 0,45 uM antes de purificación mediante cromatografía de afinidad Ni/NTA (Quiagen).

Protocolo de cromatografía:

- 35 Equilibrar la muestra de carga con 10 CV de LB, lavar con 10 CV de tampón RIPA (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% de NP40, EDTA 1 mM, 0,25% de deoxicolato sódico, β-mercaptoetanol 20 mM recién agregado, PMSF 1 mM), lavar con 10 CV de 1X KB (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 4 mM, NaF 1 mM, β-mercaptoetanol 2 mM), eluir con un gradiente lineal de 1X KB conteniendo imidazol 200 mM.

Ambas enzimas eran aproximadamente un 90% puras y tenían actividad de autofosforilación.

Reacciones: enzima 170-200 nM en 1X KB, series de dilución del compuesto en 1X KB/16% de DMSO (20 μM hasta 1 nM de concentración final con 4% de DMSO de concentración final); las reacciones se iniciaron agregando mezcla de ATP (ATP 4 μM/³³P-α-ATP 1 μCi de concentraciones finales) en 1X KB.

- 40 Las reacciones se incubaron a 30°C durante 1 hora. Las reacciones se interrumpieron y cuantificaron usando precipitación de TCA/BSA convencional sobre placas de filtro de fibra de vidrio Millipore FB y mediante recuento por centelleo líquido sobre un MicroBeta JET.

El compuesto divulgado en la presente invención inhibe el dominio quinasa del receptor Tipo I de TGF-β1 (RIT204D) con un valor IC₅₀ de 56 nM.

- 45 Los compuestos de la presente invención son preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas administradas mediante una diversidad de vías. Lo más preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, y otros, ed., 19th ed., Mack Publishing Co., (1995).

5 Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces dentro de un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones diarias normalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, las proporciones de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anterior pueden ser más que adecuadas, en tanto que, en otros casos, pueden usarse intervalos de dosificación aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial y, en consecuencia, el intervalo de dosificación no está destinado a limitar de ninguna manera el alcance de la invención. Se sobreentiende que la cantidad del compuesto realmente administrado será determinada por un médico, a la vista de las circunstancias relevantes, incluyendo el estado a tratar, la vía elegida de administración, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

10

REIVINDICACIONES

1. 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato en una forma cristalina.
- 5 2. 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino de la reivindicación 1, **caracterizado** además por el patrón de difracción de polvo por rayos X (radiación Cu, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) que comprende un pico a $9,05$, y uno o más picos seleccionados entre el grupo que comprende $11,02$, $11,95$, y $11,84$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
- 10 3. 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino que comprende el 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato de la reivindicación 1, **caracterizado** además por el patrón de difracción de polvo por rayos X (radiación Cu, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) que comprende un pico a $9,05$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
- 15 4. 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino de la reivindicación 1, **caracterizado** además por la resonancia magnética nuclear ^{13}C de estado sólido que tiene un desplazamiento químico (ppm) de $108,8$, $115,6$, $122,6$, y $171,0$ ($\pm 0,2$) ppm.
- 20 5. Una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los compuestos de las reivindicaciones 1-4 y un excipiente, diluyente o vehículo aceptable farmacéuticamente.
6. El compuesto tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en terapia.
7. El uso del compuesto tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de neoplasmas susceptibles.
- 25 8. El uso del compuesto tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovarios, cáncer endometrial, cáncer testicular, osteosarcoma, o mieloma múltiple.
9. El compuesto tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de neoplasmas susceptibles.
10. El compuesto tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovarios, cáncer endometrial, cáncer testicular, osteosarcoma, o mieloma múltiple.
- 30 11. Un procedimiento de fabricación de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino, que comprende las etapas de cristalización de la base libre anhidra o la recristalización del monohidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol a partir de una relación de aproximadamente 0-90% de disolvente orgánico a agua.
- 35 12. Un procedimiento de fabricación de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol monohidrato cristalino, que comprende las etapas de resuspensión del 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolein-4-il]-5,6-dihidro-4H-pirrol[1,2-b]pirazol en 0-90% de disolvente orgánico a agua.