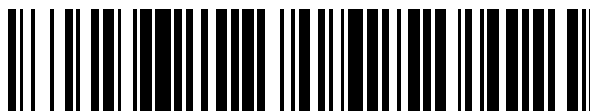


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 284**

51 Int. Cl.:
C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07805959 .9**
96 Fecha de presentación: **21.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2062886**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

54 Título: **SAL DE UN DERIVADO DE FENOPIRIDINA, O CRISTAL DE LA MISMA, Y PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA.**

30 Prioridad:
23.08.2006 US 508322
16.02.2007 JP 2007036690
20.02.2007 US 890769 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
Eisai R&D Management Co., Ltd.
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:
MATSUSHIMA, Tomohiro;
SHIROTORI, Shuji;
TAKAHASHI, Keiko;
KAMADA, Atsushi;
WAKASUGI, Kazunori y
SAKAGUCHI, Takahisa

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 375 284 T3

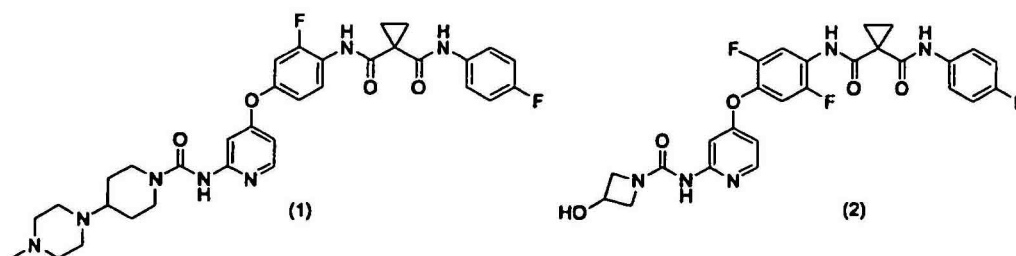
DESCRIPCIÓN

Sal de un derivado de fenoxipiridina, o cristal de la misma, y procedimiento de producción de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a sales de un derivado de fenoxipiridina, y cristales de la misma, que tienen actividad inhibidora contra el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como "HGFR") y son útiles como agentes anti-tumorales e inhibidores de metástasis del cáncer, y a procedimientos para su preparación.

10 Más específicamente, se refiere a sales de adición de ácidos de *N*-(2-fluoro-4-{{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (fórmula (1) a continuación, en lo sucesivo en el presente documento denominado "Compuesto 1") o cristales de la misma, y a sales de *N*-(2,5-difluoro-4-{{[2-({[3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (fórmula (2) a continuación, en lo sucesivo en el presente documento denominado "Compuesto 2") o cristales de la misma, y a procedimientos para su preparación.

15 **Técnica anterior**

Se ha informado de la sobre-expresión de HGFR en diversas clases de tumores, tales como un cáncer pancreático, un cáncer gástrico, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer renal, un tumor cerebral y un cáncer de ovarios (Documento distinto de patente 1). Se considera que el HGFR expresado en estas células cancerosas está implicado en la malignidad cancerosa (crecimiento aberrante, invasión o metástasis potenciada), porque HGFR provoca la auto-fosforilación de la tirosina quinasa intracelular de forma constitutiva o tras la estimulación por el factor de crecimiento de hepatocitos (en lo sucesivo en el presente documento denominado "HGF").

25 Se ha informado también de que el HGFR está expresado en células endoteliales vasculares y está implicado en angiogénesis tumoral, puesto que HGF estimula HGFR para facilitar la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares (Documento distinto de patente 2).

Adicionalmente, se ha informado de que NK4, un péptido antagonista para HGF, bloquea la señal de HGF-HGFR para inhibir la invasión de células cancerosas y angiogénesis tumoral (Documentos distintos de patente 3 y 4).

Por lo tanto, se espera que un compuesto que tiene actividad inhibidora contra HGFR sea útil como un agente anti-tumoral, un inhibidor de angiogénesis o un inhibidor para metástasis del cáncer.

30 Curiosamente, el Documento de Patente 1 desvela derivados de fenoxipiridina que tienen actividad inhibidora contra HGFR y procedimientos para prepararlos, pero no desvela ni sugiere el Compuesto 1 y Compuesto 2, ni las sales del Compuesto 1 y el Compuesto 2 o los cristales de las mismas, ni los procedimientos para su preparación. El Compuesto 1 y el Compuesto 2 se desvelan en el documento WO2007/023768

[Documento de Patente 1] WO 2005/082855

35 [Documento distinto de patente 1] Oncology Reports, 5, 1013-1024 (1998)

[Documento distinto de patente 2] Advances in Cancer Research, 67, 257-279 (1995)

[Documento distinto de patente 3] British Journal of Cancer, 84, 864-873 (2001)

[Documento distinto de patente 4] Cancer Sci., 94, 321 -327 (2003)

Divulgación de la invención**Problemas a resolver por la invención**

- 5 Es un objeto de la presente invención proporcionar sales de un derivado de fenoxipiridina, o cristales de la misma, que presenten actividad inhibidora contra HGFR, sean útiles como agentes anti-tumorales e inhibidores para metástasis del cáncer, tengan excelentes propiedades físicas y sean muy útiles como medicamentos, así como a procedimientos para su preparación.

Medios para resolver los problemas

Para conseguir el objeto indicado anteriormente, la invención proporciona lo siguiente:

- 10 <1> Una sal de adición de ácidos de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico y ácido tartárico;
- 15 <2> Cristales de malato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida;
- <3> Cristales de acuerdo con <2>, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $17,7^\circ$, $19,0^\circ$ y $23,5^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo;
- <4> Cristales de tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida;
- 20 <5> Cristales de acuerdo con <4>, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $12,2^\circ$, $17,7^\circ$ y $23,4^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo;
- <6> Cristales de acuerdo con <4>, que tienen picos a desplazamientos químicos ($\pm 0,5$ ppm) de 175,7 ppm, 166,7 ppm, 154,9 ppm y 45,7 ppm en un espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C sólido;
- 25 <7> Una sal de adición de ácidos de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido 4-metilbencenosulfónico;
- <8> Cristales de una sal de adición de ácidos de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en
- 30 ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido etanosulfónico y ácido bencenosulfónico;
- <9> Cristales de metanosulfonato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida.
- <10> Cristales de acuerdo con <9>, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $17,7^\circ$, $20,4^\circ$ y $21,7^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo;
- 35 <11> Cristales de 4-metilbencenosulfonato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida;
- <12> Cristales de acuerdo con <11>, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $7,2^\circ$, $17,3^\circ$ y $23,6^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo;
- 40 <13> Un procedimiento para preparar cristales de malato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, caracterizado por mezclar *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes, y ácido málico para formar una solución, y depositar después los cristales;
- 45 <14> Un procedimiento para preparar cristales de tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, caracterizado por mezclar *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes, agua, y ácido tartárico para formar una

solución, y depositar después los cristales;

<15> Un procedimiento para preparar cristales de tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, caracterizado por mezclar *N*-(2-fluoro-4-[[2-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, agua y ácido tartárico para formar una solución, y añadir después un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes para depositar los cristales;

<16> Un procedimiento para preparar cristales de una sal de adición de ácidos de *N*-(2,5-difluoro-4-[[2-[[3-hidroxiazetidin-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, caracterizado por mezclar *N*-(2,5-difluoro-4-[[2-[[3-hidroxiazetidin-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes y un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido 4-metilbencenosulfónico para formar una solución, y depositar después los cristales;

<17> Una composición farmacéutica que comprende cristales de acuerdo con uno cualquiera de <2> a <6>;

<18> Un agente anti-tumoral que comprende cristales de acuerdo con uno cualquiera de <2> a <6>;

<19> Un inhibidor para metástasis del cáncer que comprende cristales de acuerdo con uno cualquiera de <2> a <6>;

<20> Una composición farmacéutica que comprende cristales de acuerdo con uno cualquiera de <8> a <12>;

<21> Un agente anti-tumoral que comprende cristales de acuerdo con uno cualquiera de <8> a <12>;

<22> Un inhibidor para metástasis del cáncer que comprende cristales de acuerdo con uno cualquiera de <8> a <12>;

<23> Se desvela un procedimiento para prevenir o tratar cáncer que comprende administrar a un paciente, una dosis farmacológicamente eficaz de cristales de acuerdo con uno cualquiera de <2> a <6>;

<24> Uso de cristales de acuerdo con uno cualquiera de <2> a <6> para la fabricación de un agente profiláctico o terapéutico para el cáncer;

<25> Se desvela un procedimiento para prevenir o tratar cáncer que comprende administrar a un paciente, una dosis farmacológicamente eficaz de cristales de acuerdo con uno cualquiera de <8> a <12>; y

<26> Uso de cristales de acuerdo con uno cualquiera de <8> a <12> para la fabricación de un agente profiláctico o terapéutico para el cáncer.

Efecto de la invención

Las sales de un derivado de fenoxipiridina y los cristales de la misma de acuerdo con la invención tienen excelentes propiedades físicas (solubilidad, estabilidad, etc.) y son útiles como agentes anti-tumorales, inhibidores de angiogénesis e inhibidores para metástasis del cáncer para diversos tipos de tumores, incluyendo un cáncer pancreático, un cáncer gástrico, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer renal, un tumor cerebral y un cáncer de ovarios.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del malato del Compuesto 1 obtenidos en el Ejemplo 1-7 (Procedimiento 1).

La Fig. 2 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del tartrato del Compuesto 1 obtenidos en el Ejemplo 1-8 (Procedimiento 1).

La Fig. 3 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del clorhidrato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-1.

La Fig. 4 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del bromhidrato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-2.

La Fig. 5 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del 1/2 sulfato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-3.

La Fig. 6 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del metanosulfonato del

Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-4 (Procedimiento 1).

La Fig. 7 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del etanosulfonato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-5.

5 La Fig. 8 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del bencenosulfonato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-6.

La Fig. 9 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del 4-metilbencenosulfonato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-7 (Procedimiento 1).

La Fig. 10 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para el malato amorfo del Compuesto 1 obtenido en el Ejemplo 1-7 (Procedimiento 2).

10 La Fig. 11 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para el tartrato amorfo del Compuesto 1 obtenido en el Ejemplo 1-8 (Procedimiento 5).

La Fig. 12 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para el metanosulfonato amorfo del Compuesto 2 obtenido en el Ejemplo 2-4 (Procedimiento 2).

15 La Fig. 13 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para los cristales del 4-metilbencenosulfonato del Compuesto 2 obtenidos en el Ejemplo 2-7 (Procedimiento 2).

La Fig. 14 muestra un espectro RMN de ^{13}C sólido para los cristales del tartrato del Compuesto 1 obtenidos en el Ejemplo 1-8 (Procedimiento 4).

Mejor modo para realizar la invención

La presente invención se explicará ahora con mayor detalle.

20 La sal de adición de ácidos de la invención es 1) una sal de adición de ácidos de *N*-(2-fluoro-4-[[2-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (Compuesto 1), seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico y ácido tartárico, o 2) una sal de adición de ácidos de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidin-1-il)carbonil] amino} piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (Compuesto 2), seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido 4-metilbencenosulfónico. Una sal de adición de ácidos de la invención puede que no sea un solvato, o que sea un solvato tal como un hidrato, y no hay limitación en el número de moléculas en el ácido añadido. Las sales de adición de ácidos de acuerdo con la invención incluyen no solo los siguientes cristales de la invención, sino también sales amorfas de adición de ácidos del Compuesto 1 y sales amorfas de adición de ácidos del Compuesto 2.

30 Los cristales de acuerdo con la invención son 1) cristales de malato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (Compuesto 1), 2) cristales de tartrato del Compuesto 1, 3) cristales de clorhidrato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidin-1-il)carbonil]amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (Compuesto 2), 4) cristales de bromhidrato del Compuesto 2, 5) cristales de 1/2 sulfato del Compuesto 2, 6) cristales de metanosulfonato del Compuesto 2, 7) cristales de etanosulfonato del Compuesto 2, 8) cristales de bencenosulfonato del Compuesto 2 y 9) cristales de 4-metilbencenosulfonato del Compuesto 2. Los cristales de malato del Compuesto 1 incluyen cristales de *D*-malato y cristales de *L*-malato del Compuesto 1, y los cristales de tartrato del Compuesto 1 incluyen cristales de *D*-tartrato y cristales de *L*-tartrato del Compuesto 1.

40 Los cristales de malato del Compuesto 1 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $17,7^\circ$, $19,0^\circ$ y $23,5^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo, y preferentemente picos de difracción a $10,8^\circ$, $12,3^\circ$, $14,3^\circ$, $17,7^\circ$, $19,0^\circ$, $19,7^\circ$, $21,7^\circ$, $22,0^\circ$, $23,5^\circ$ y $24,7^\circ$.

45 Los cristales de tartrato del Compuesto 1 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $12,2^\circ$, $17,7^\circ$ y $23,4^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo, y preferentemente picos de difracción a $10,7^\circ$, $12,2^\circ$, $14,3^\circ$, $17,7^\circ$, $19,0^\circ$, $19,6^\circ$, $21,4^\circ$, $22,1^\circ$, $23,4^\circ$ y $24,8^\circ$.

Los cristales de clorhidrato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $7,4^\circ$, $10,3^\circ$, $12,0^\circ$, $13,9^\circ$, $15,0^\circ$, $16,5^\circ$, $24,7^\circ$, $25,1^\circ$, $25,9^\circ$ y $26,6^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.

Los cristales de bromhidrato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $8,3^\circ$, $10,4^\circ$, $12,2^\circ$, $14,0^\circ$, $16,2^\circ$, $17,7^\circ$, $19,5^\circ$, $20,4^\circ$, $25,3^\circ$ y $28,0^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.

Los cristales de 1/2 sulfato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $6,5^\circ$, $6,9^\circ$, $9,3^\circ$, $16,0^\circ$, $18,7^\circ$, $19,5^\circ$, $22,0^\circ$, $22,9^\circ$, $23,9^\circ$ y $26,7^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.

Los cristales de metanosulfonato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $17,7^\circ$, $20,4^\circ$ y $21,7^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo, y preferentemente picos de difracción a $7,9^\circ$, $9,9^\circ$, $13,9^\circ$, $17,7^\circ$, $19,1^\circ$, $20,4^\circ$, $21,7^\circ$, $22,4^\circ$, $23,3^\circ$ y $25,8^\circ$.

Los cristales de etanosulfonato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $6,7^\circ$, $10,1^\circ$, $12,7^\circ$, $13,7^\circ$, $16,9^\circ$, $18,5^\circ$, $19,4^\circ$, $21,5^\circ$, $22,1^\circ$ y $23,4^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.

Los cristales de bencenosulfonato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $7,8^\circ$, $8,3^\circ$, $8,8^\circ$, $13,7^\circ$, $17,4^\circ$, $18,5^\circ$, $19,7^\circ$, $20,8^\circ$, $24,3^\circ$ y $24,6^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.

Los cristales de 4-metilbencenosulfonato del Compuesto 2 tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $7,2^\circ$, $17,3^\circ$ y $23,6^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo, y preferentemente picos de difracción a $7,2^\circ$, $13,4^\circ$, $17,3^\circ$, $18,8^\circ$, $19,3^\circ$, $20,6^\circ$, $21,1^\circ$, $23,6^\circ$, $24,6^\circ$ y $26,1^\circ$.

Puesto que puede ocurrir un error dentro de un intervalo de $\pm 0,2^\circ$ para un ángulo de difracción $1 (2\theta)$ en una difracción de rayos X en polvo en general, es necesario entender que los valores anteriores del ángulo de difracción incluyen también valores numéricos dentro de un intervalo de $\pm 0,2^\circ$ del mismo. Por lo tanto, la presente invención abarca cristales para que los ángulos de difracción encajen dentro de un intervalo de error de $\pm 0,2^\circ$ en difracción de rayos X en polvo, así como cristales para los que los ángulos de difracción encajan completamente en una difracción de rayos X en polvo.

Los cristales de tartrato del Compuesto 1 tienen picos a desplazamientos químicos ($\pm 0,5$ ppm) de $175,7$ ppm, $166,7$ ppm, $154,9$ ppm y $45,7$ ppm en un espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C sólido (en lo sucesivo en el presente documento denominado espectro de ^{13}C de RMN sólido).

Puesto que puede ocurrir algún grado de error para un desplazamiento químico (ppm) en un espectro de ^{13}C de RMN sólido, en general, la invención abarca no solo los cristales para los que los picos (desplazamientos químicos) en un espectro de RMN de ^{13}C sólido encajarán completamente, sino también los cristales que tienen picos sustancialmente equivalentes a los desplazamientos químicos cuando se mide un espectro de RMN de ^{13}C sólido en condiciones de medición normales, o sustancialmente en las mismas condiciones que las descritas en la presente memoria descriptiva, y específicamente se interpreta que incluye valores en un intervalo de aproximadamente $\pm 0,5$ ppm. Específicamente, por ejemplo, la presente invención abarca cristales para los que los picos (desplazamientos químicos) encajan dentro de un intervalo de error de aproximadamente $\pm 0,5$ ppm en un espectro de RMN de ^{13}C sólido, así como cristales para los que los picos encajan completamente.

[Procedimientos Generales para la Preparación]

Se describirán ahora los procedimientos para preparar cristales de sales del Compuesto 1 y el Compuesto 2 de acuerdo con la invención.

1. Procedimiento para preparar cristales de malato del Compuesto 1

Los cristales de malato del Compuesto 1 pueden prepararse mezclando el Compuesto 1, un disolvente y ácido málico para formar una solución y permitiendo después que los cristales se depositen.

Más específicamente, por ejemplo, los cristales de malato del Compuesto 1 pueden prepararse mezclando el Compuesto 1 y un disolvente a temperatura ambiente y añadiendo ácido málico a temperatura ambiente, o en condiciones de calentamiento, para formar una solución, permitiendo después que la solución se enfríe lentamente a entre aproximadamente 4°C y temperatura ambiente para depositar el cristal. La solución se agita preferentemente, mientras se permite que se enfríe lentamente.

El disolvente usado pueden ser cetonas tales como acetona, o alcoholes tales como etanol, 1-propanol o 2-propanol, prefiriéndose el etanol.

El volumen de disolvente no está particularmente restringido, aunque es preferentemente 5-30 veces el volumen del Compuesto 1.

La cantidad de ácido málico usada puede ser 1,0-1,5 equivalentes con respecto al Compuesto 1.

La temperatura de calentamiento no está particularmente restringida, aunque es preferentemente 40°C - 60°C .

El lento enfriamiento de la temperatura de calentamiento a la temperatura ambiente (o aproximadamente 4°C) puede realizarse en un periodo entre 5 minutos y 24 horas.

2. Procedimiento para preparar cristales de tartrato del Compuesto 1

Los cristales de tartrato del Compuesto 1 pueden prepararse mezclando el Compuesto 1, un disolvente y ácido tartárico para formar una solución, y permitiendo después que los cristales se depositen.

- 5 Más específicamente, por ejemplo, 1) los cristales de tartrato del Compuesto 1 pueden prepararse mezclando el Compuesto 1 y un disolvente a temperatura ambiente y añadiendo agua y ácido tartárico a temperatura ambiente, o en condiciones de calentamiento, para formar una solución, permitiendo después que la solución se enfríe lentamente a entre aproximadamente 4 °C y temperatura ambiente para depositar los cristales.

- 10 La solución se agitó preferentemente mientras se dejaba enfriar. Como alternativa, 2) los cristales de tartrato del Compuesto 1 pueden prepararse mezclando el Compuesto 1 y agua a temperatura ambiente y añadiendo ácido tartárico a temperatura ambiente para formar una solución acuosa, añadir después un disolvente a la solución acuosa mientras se agitaba para depositar los cristales. Como alternativa, 3) los cristales de tartrato del Compuesto 1 pueden prepararse añadiendo una solución del Compuesto 1 a una solución acuosa de ácido tartárico y añadiendo un disolvente a la solución mientras se agitaba para depositar los cristales.

- 15 Como los disolventes pueden usarse, por ejemplo, cetonas tales como acetona y alcoholes tales como etanol, 1-propanol y 2-propanol, entre los cuales se prefiere acetona y etanol.

El volumen de disolvente no está particularmente restringido, aunque es preferentemente 5-30 veces el volumen del Compuesto 1.

La cantidad de ácido tartárico usada puede ser 1,0-1,5 equivalentes con respecto al Compuesto 1.

- 20 La temperatura de calentamiento no está particularmente restringida, aunque es preferentemente 40 °C-60 °C.

El lento enfriamiento desde la temperatura de calentamiento a temperatura ambiente (o aproximadamente 4 °C) puede realizarse durante 5 minutos-24 horas.

3. Procedimiento para preparar cristales de una sal de adición de ácidos del Compuesto 2

- 25 Los cristales de una sal de adición de ácidos del Compuesto 2 pueden prepararse mezclando el Compuesto 2, un disolvente y un ácido para formar una solución, y permitiendo después que los cristales se depositen.

- Más específicamente, por ejemplo, los cristales de una sal de adición de ácidos del Compuesto 2 pueden prepararse mezclando el Compuesto 2 y un disolvente a temperatura ambiente, y añadiendo un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido 4-metilbencenosulfónico a temperatura ambiente, o en condiciones de calentamiento, para formar una solución, permitiendo después que la solución se enfríe lentamente a entre aproximadamente 4 °C y temperatura ambiente para depositar los cristales. La solución se agita preferentemente, mientras se permite que se enfríe lentamente.
- 30

El disolvente usado pueden ser cetonas, tales como acetona o alcoholes, tales como etanol, 1-propanol o 2-propanol, prefiriéndose el etanol. En algunos casos, también puede añadirse agua al disolvente.

- 35 El volumen de disolvente no está particularmente restringido, aunque es preferentemente 10-20 veces el volumen del Compuesto 2. La cantidad de ácido usada puede ser de 1,0-1,5 equivalentes con respecto al Compuesto 2. La temperatura de calentamiento no está particularmente restringida, aunque es preferentemente 40 °C-60 °C.

El lento enfriamiento desde la temperatura de calentamiento a temperatura ambiente (o aproximadamente 4 °C) puede realizarse durante 5 minutos-24 horas.

- 40 Cuando los cristales de la invención se usan como medicamentos, los cristales de la invención normalmente se combinarán con los aditivos apropiados y se formularán para su uso. Sin embargo, esto no niega el uso de los cristales de la invención en formas a granel como medicamentos.

- Dichos aditivos pueden incluir excipientes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes colorantes, correctores del sabor, emulsionantes, tensioactivos, adyuvantes de disolución, agentes de suspensión, agentes de isotonicación, agentes tamponantes, antisépticos, antioxidantes, estabilizadores, aceleradores de absorción y similares, que se usan muy habitualmente en medicamentos, y pueden añadirse en las combinaciones apropiadas, según se desee.
- 45

Como ejemplos de dichos excipientes pueden mencionarse lactosa, azúcar blanco, glucosa, almidón de maíz, manitol, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, dextrina, celulosa cristalina, anhídrido silícico, silicato de

aluminio, silicato de calcio, aluminometasilicato de magnesio, hidrogenofosfato de calcio, y similares.

Como ejemplos de aglutinantes pueden mencionarse alcohol polivinílico, metilcelulosa, etilcelulosa, goma arábica, tragacanto, gelatina, goma laca, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, macrogol, y similares.

- 5 Como ejemplos de lubricantes pueden mencionarse estearato de magnesio, estearato de calcio, estearil fumarato sódico, talco, polietilenglicol, sílice coloidal, y similares.

Como ejemplos de disgregantes, pueden mencionarse celulosa cristalina, goma de agar, gelatina, carbonato de calcio, hidrogenocarbonato sódico, citrato de calcio, dextrina, pectina, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa sódica, carboximetil almidón, y carboximetil almidón sódico, y similares.

- 10

Como agentes colorantes pueden mencionarse aquellos aprobados para adición a productos farmacéuticos, tales como sesquióxido de hierro, sesquióxido de hierro amarillo, carmín, caramelo, β -caroteno, óxido de titanio, talco, riboflavina fosfato sódico, laca de aluminio amarilla y similares.

- 15 Como correctores del sabor pueden mencionarse cacao en polvo, mentol, polvos aromáticos, aceite de menta, borneol, corteza de canela en polvo, y similares.

Como emulsionantes o tensioactivos pueden mencionarse estearil trietanolamina, lauril sulfato sódico, ácido laurilaminopropiónico, lecitina, monoestearato de glicerina, ésteres de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácido graso de glicerina, y similares. Como adyuvantes de disolución pueden mencionarse polietilenglicol, propilenglicol, benzoato de bencilo, etanol, colesterol, trietanolamina, carbonato sódico, citrato sódico, polisorbato 80, nicotinamida, y similares.

- 20

Como agentes de suspensión pueden mencionarse los tensioactivos mencionados anteriormente, así como polímeros hidrófilos tales como alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa; hidroxipropilcelulosa y similares.

Como agentes de isotonización pueden mencionarse glucosa, cloruro sódico, manitol, sorbitol y similares.

- 25 Como agentes tamponantes pueden mencionarse soluciones tamponantes de fosfato, acetato, carbonato, citrato y similares.

Como agentes antisépticos pueden mencionarse metilparabeno, propilparabeno, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenético, ácido deshidroacético, ácido sórbico, y similares.

Como antioxidantes pueden mencionarse sulfito, ácido ascórbico, α -tocoferol, y similares.

- 30 Como las formulaciones pueden mencionarse formas orales tales como comprimidos, polvos, gránulos, cápsulas, jarabe, pastillas e inhaladores; formas externas, tales como supositorios, pomadas, bálsamos para los ojos, cintas, gotas para los ojos, gotas para la nariz, gotas para los oídos, emplastos, lociones, y similares; e inyecciones.

Las formas orales mencionadas anteriormente pueden formularse con las combinaciones apropiadas de los aditivos mencionados anteriormente. Sus superficies pueden estar también revestidas, si fuera necesario.

- 35 Las formas externas mencionadas anteriormente pueden formularse con las combinaciones apropiadas de los aditivos mencionados anteriormente, y especialmente excipientes, aglutinantes, correctores del sabor, emulsionantes, tensioactivos, adyuvantes de disolución, agentes de suspensión, agentes de isotonización, agentes antisépticos, antioxidantes, estabilizadores y aceleradores de absorción.

Las inyecciones pueden formularse también con las combinaciones apropiado de los aditivos mencionados anteriormente, y especialmente emulsionantes, tensioactivos, adyuvantes de disolución, agentes de suspensión, agentes de isotonización, agentes tamponantes, agentes antisépticos, antioxidantes, estabilizadores y aceleradores de absorción.

- 40

Cuando los cristales de la invención se usan como medicamentos, su dosificación diaria dependerá de los síntomas y la edad del paciente, aunque normalmente será de 0,1 mg a 10 g (preferentemente de 1 mg a 2 g) para una formulación oral, de 0,01 mg a 10 g (preferentemente de 0,1 mg a 2 g) para una preparación externa y de 0,01 mg a 10 g (preferentemente de 0,1 mg a 2 g) para una inyección, de una vez o dividida en 2 a 4 dosis.

- 45

Los cristales de la invención son útiles como agentes anti-tumorales, inhibidores de angiogénesis o inhibidores para metástasis del cáncer.

Cuando los cristales de la invención se usan como un agente antitumoral, el tumor puede ser un cáncer pancreático, un cáncer gástrico, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer renal, un tumor cerebral o un cáncer de ovarios, siendo un cáncer gástrico la diana preferida.

Ejemplos

- 5 Las sales de los compuestos de acuerdo con la invención o cristales de los mismos pueden prepararse por los procedimientos descritos mediante los siguientes ejemplos de producción y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos específicos son meramente ilustrativos y los compuestos de la invención no están restringidos de ninguna manera por estos ejemplos específicos.

10 A lo largo de los ejemplos de producción, a menos que se indique otra cosa, se usó YMC SIL-60-400/230W como el gel de sílice para la purificación.

(Ejemplo de Producción 1-1) 4-Cloropiridin-2-carboxilato de etilo

15 Una mezcla de ácido 4-cloropiridin-2-carboxílico (39,4 g) y cloruro de tionilo (64 ml) se agitó y calentó a 100 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 6 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con tolueno. El residuo se añadió gradualmente a etanol y se agitó sobre hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 25,5 horas. La mezcla de reacción se concentró después a presión reducida. Una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico se añadió al residuo y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. La fase orgánica secada se concentró a presión reducida dando el compuesto del título en forma de un aceite pardo (38,8 g, 83,6%).

20 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1,46 (3 H, t, J = 7,2 Hz), 4,50 (2 H, c, J = 7,2 Hz), 7,49 (1 H, dd, J = 2,0, 5,2 Hz), 8,15 (1 H, d, J = 2,0 Hz), 8,67 (1 H, d, J = 5,2 Hz).

(Ejemplo de Producción 1-2) 4-(3-Fluoro-4-nitrofenoxi)piridin-2-carboxilato de etilo

25 A 4-cloropiridin-2-carboxilato de etilo (19,4 g) se le añadieron 3-fluoro-4-nitrofenol (24,7 g) y clorobenceno (7,0 ml), y la mezcla se agitó y calentó a 120 °C en una atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Después de añadir acetato de etilo (400 ml) y una solución acuosa saturada de carbonato sódico (400 ml), la mezcla se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 27 horas. La agitación se suspendió y la fase acuosa se retiró por separación. Una solución acuosa saturada de carbonato sódico se añadió adicionalmente a la fase orgánica y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La agitación se suspendió y la fase acuosa se retiró por separación. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: heptano:acetato de etilo = 2:1 a 1:1, después acetato de etilo). Las fracciones que contenían el compuesto diana se concentraron dando el compuesto del título en forma de un aceite pardo (12,9 g, 40,2%).

35 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1,45 (3 H, t, J = 7,2 Hz), 4,49 (2 H, c, J = 7,2 Hz), 6,97-7,01 (2 H, m), 7,16 (1 H, dd, J = 2,4, 5,6 Hz), 7,79 (1 H, d, J = 2,4 Hz), 8,20 (1 H, m), 8,76 (1 H, d, J = 5,6 Hz).

ENI-EM (m/z): 329 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(Ejemplo de Producción 1-3) Ácido 4-(4-benciloxicarbonilamino-3-fluorofenoxi)piridin-2-carboxílico

40 A una solución de 4-(3-fluoro-4-nitrofenoxi)piridin-2-carboxilato de etilo (8,56 g) en etanol (150 ml) se le añadió hidróxido de paladio al 20% sobre carbono (1,0 g), y la mezcla de reacción se agitó durante 9,5 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de hidrógeno. El catalizador se retiró por filtración. Después de añadir una solución 4 N de ácido clorhídrico en acetato de etilo (14 ml) al filtrado, la mezcla se concentró. La concentración se suspendió antes de que la mezcla se secara a sequedad. Después se añadieron agua (75 ml), acetona (150 ml) e hidrogenocarbonato sódico (11,8 g). La mezcla se agitó mientras se enfriaba en hielo y se añadió cloruro de benciloxicarbonilo (6,00 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, la mezcla se concentró a presión reducida, y el residuo se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Se concentró después a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: heptano:acetato de etilo = 1:1 a 1:2, después acetato de etilo). Las fracciones que contenían el compuesto diana se concentraron a presión reducida. El sólido obtenido se suspendió añadiendo hexano. Después de dejar que la suspensión reposara un rato, el sobrenadante se retiró con una pipeta. El residuo se secó dando 4-(4-benciloxicarbonilamino-3-fluorofenoxi)piridin-2-carboxilato de etilo en forma de un sólido amarillo pálido (7,51 g, 65,4%).

50 Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1,43 (3 H, m), 4,45-4,52 (2 H, m), 5,24 (2 H, s), 6,87-6,92 (2 H, m), 6,99 (1

H, dd, J = 2,4, 5,6 Hz), 7,35-7,45 (6 H, m), 7,65 (1 H, d, J = 2,4 Hz), 8,19 (1 H, m), 8,60 (1 H, d, J = 5,6 Hz).

Se disolvió 4-(4-benciloxicarbonilamino-3-fluorofenil)piridin-2-carboxilato de etilo (7,95 g) en etanol (120 ml), y se añadió agua (25 ml). Se añadió hidróxido de litio (783 mg) mientras se agitaba a temperatura ambiente, y la agitación se continuó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de añadir ácido clorhídrico 1 N (60 ml) a la mezcla de reacción, se concentró a presión reducida. Después de la concentración, los cristales precipitados en la mezcla de reacción se recogieron por filtración y se lavaron con agua. Los cristales se disolvieron en acetato de etilo-tetrahidrofurano y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La solución secada se concentró a presión reducida. Los cristales obtenidos se suspendieron en hexano y se recogieron por filtración. Los cristales se secaron dando el compuesto diana en forma de cristales de color amarillo pálido (5,04 g, 72,0%).

10 Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 5,18 (2 H, s), 7,08 (1 H, m), 7,23 (1 H, m), 7,24-7,46 (8 H, m), 7,75 (1 H, m), 8,59 (1 H, d, J = 5,6 Hz), 9,59 (1 H, s).

(Ejemplo de Producción 1-4) [4-(4-Benciloxicarbonilamino-3-fluorofenoxi)piridin-2-il]carbamato de *terc*-butilo

15 A una suspensión de ácido 4-(4-benciloxicarbonilamino-3-fluorofenoxi)piridin-2-carboxílico (5,04 g) en *terc*-butanol (50 ml) se le añadió trietilamina (4,6 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó. Después se añadió difenilfosforil azida (3,13 ml) a temperatura ambiente y la agitación se continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Después se realizó una agitación calentada a 90 °C durante 30 minutos y a 100 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió acetato de etilo (25 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos mientras se enfriaba sobre hielo. Los cristales precipitados se recogieron por filtración y se lavaron con éter dietílico. Los cristales se secaron después con aireación durante 1 hora a temperatura ambiente dando el compuesto del título en forma de cristales incoloros (3,92 g, 65,5%).

20 Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,42 (9 H, s), 5,17 (2 H, s), 6,62 (1 H, dd, J = 2,4, 5,6 Hz), 7,01 (1 H, dd, J = 2,2, 8,8 Hz), 7,21 (1 H, dd, J = 2,2, 11,2 Hz), 7,35-7,42 (6 H, m), 7,70 (1 H, m), 8,14 (1 H, d, J = 5,6 Hz), 9,53 (1 H, s), 9,83 (1 H, s).

(Ejemplo de Producción 1-5) [4-(2-Aminopiridin-4-iloxi)-2-fluorofenil]carbamato de bencilo

25 Una solución 4 N de ácido clorhídrico en solución de acetato de etilo (120 ml) se enfrió en un baño de hielo. A ésta se le añadió [4-(4-benciloxicarbonilamino-3-fluorofenoxi)piridin-2-il]carbamato de *terc*-butilo (3,92 g) mientras se agitaba y la mezcla se agitó adicionalmente durante 10 minutos en un baño de hielo. La mezcla de reacción se agitó después adicionalmente durante 3,5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Después se añadieron acetato de etilo (150 ml) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (70 ml) y se repartieron. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. La fase orgánica secada se concentró a presión reducida. Los cristales obtenidos se suspendieron en un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (5:1). Los cristales se recogieron por filtración y se lavaron con un disolvente mixto de hexano y acetato de etilo (5:1). Los cristales se secaron después por succión a temperatura ambiente dando el compuesto del título en forma de cristales de color amarillo pálido (2,93 g, 95,9%).

30 Espectro de RMN de ^1H (CDCl $_3$) δ (ppm): 4,49 (2 H, m), 5,23 (2 H, s), 5,95 (1 H, d, J = 2,0 Hz), 6,26 (1 H, dd, J = 2,0, 6,0 Hz), 6,84-6,90 (2 H, m), 7,00 (1 H, m), 7,34-7,42 (5 H, m), 7,94 (1 H, d, J = 6,0 Hz), 8,10 (1 H, m).

35 ENI-EM (m/z): 354 [M+H] $^+$.

(Ejemplo de Producción 1-6) N-[4-(3-Fluoro-4-[[1-(4-fluorofenilcarbamoil)ciclopropanocarbonil]amino]fenoxi)piridin-2-il]-N-fenoxicarbonilcarbamato de fenilo

40 A una solución de [4-(2-aminopiridin-4-iloxi)-2-fluorofenil]carbamato de bencilo (1,25 g) en tetrahidrofurano (100 ml) se le añadieron trietilamina (1,48 ml) y cloroformato de fenilo (1,11 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se destiló dando un producto en bruto de N-[4-(4-benciloxicarbonilamino-3-fluorofenoxi)piridin-2-il]-N-fenoxicarbonilcarbamato de fenilo en forma de un aceite pardo (ENI-EM (m/z): 616 [M+Na] $^+$). Este se disolvió en tetrahidrofurano (200 ml), se añadió hidróxido de paladio al 20% (497 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas en una atmósfera de hidrógeno. El catalizador se retiró por filtración. Posteriormente se lavó con tetrahidrofurano. El filtrado se concentró a 20 ml dando una solución de N-[4-(4-amino-3-fluorofenoxi)piridin-2-il]-N-fenoxicarbonilcarbamato de fenilo (ENI-EM (m/z): 482 [M+Na] $^+$, 941 [2M+Na] $^+$) en tetrahidrofurano. Esto se disolvió en N,N-dimetilformamida (50 ml). Después de añadir ácido 1-(4-fluorofenilcarbamoil)ciclopropanocarboxílico (1,58 g), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino) fosfonio (3,13 g) y trietilamina (0,987 ml), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 13,5 horas. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y salmuera. Las fases orgánicas se lavaron con una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico y salmuera en ese

orden, y se secaron sobre sulfato sódico anhidro. Después se concentraron y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (heptano:acetato de etilo = 3:2, 1:1 y 1:2) dando el compuesto del título en forma de una espuma incolora (940 mg, 40,0%).

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1,68-1,76 (4 H, m), 6,90 (1 H, dd, $J = 2,4,5,6$ Hz), 6,95 (1 H, m), 6,98 (1 H, m), 7,03-7,07 (3 H, m), 7,18 (4 H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,25 (2 H, m), 7,38 (4 H, m), 7,48 (2 H, m), 8,27 (1 H, m), 8,46 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 8,75 (1 H, s), 9,40 (1 H, s).

ENI-EM (m/z): 687 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

(Ejemplo de Producción 1) *N*-(2-Fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il}oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (Compuesto 1)

A una solución de *N*-[4-(3-fluoro-4-{[1-(4-fluorofenilcarbamoil)ciclopropanocarbonil]amino}fenoxi)piridin-2-il]-*N*-fenoxicarbonilcarbamato de fenilo (50,0 mg) en *N,N*-dimetilformamida (2,0 ml) se le añadió 1-metil-4-(piperidin-4-il)piperazina (68,7 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se retiró por destilación y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (FUJI SILYSIA NH, acetato de etilo, acetato de etilo: metanol = 20:1 a 10:1). Las fracciones que contenían el compuesto diana se concentraron. Se añadió éter dietílico:hexano = 1:3 al residuo y el precipitado depositado se recogió por filtración. Después se lavó con hexano y se secó con aireación dando el compuesto del título en forma de un polvo de color blanco (34,6 mg, 72,8%).

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) δ (ppm): 1,44 (2 H, m), 1,68 (2 H, m), 1,75 (2 H, m), 1,90 (2 H, m), 2,32 (3 H, s), 2,39-2,71 (9 H, m), 2,90 (2 H, m), 4,11 (2 H, m), 6,55 (1 H, dd, $J = 2,0, 5,6$ Hz), 6,92 (2 H, m), 7,04 (2 H, m), 7,26 (1 H, cubierto por CDCl_3), 7,50 (2 H, dd, $J = 4,8, 9,2$ Hz), 7,62 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz), 8,06 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 8,20 (1 H, m), 8,84 (1 H, s), 9,20 (1 H, s).

ENI-EM (m/z): 634 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 656 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(Ejemplo 1-1) Clorhidrato de *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il}oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida

Después de suspender *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il}oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (63,4 mg) en acetona (0,634 ml), se añadieron ácido clorhídrico 5 N (0,020 ml) y agua (0,0117 ml) a temperatura ambiente para formar una solución. La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con acetona (0,317 ml, 2 veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se secó con aire templado a 60 °C durante 1 día dando el compuesto del título (43,3 mg) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,40-1,80 (6 H, m), 2,00-3,80 (16 H, m), 4,20-4,40 (2 H, m), 6,93 (1 H, m), 7,12 (1 H, m), 7,18 (2 H, m), 7,25 (1 H, m), 7,37 (1 H, m), 7,59-7,63 (2 H, m), 8,04 (1 H, m), 8,13 (1 H, d, $J = 6,4$ Hz), 9,24 (1 H, s), 9,91 (1 H, s a), 10,76 (1 H, s a).

(Ejemplo 1-2) Bromhidrato de *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il}oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida

(Procedimiento 1)

Después de suspender *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il}oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (55,7 mg) en acetona (0,557 ml), se añadieron ácido bromhídrico acuoso al 48% (0,010 ml) y agua (0,0178 ml) a temperatura ambiente para formar una solución. La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con acetona (0,557 ml, 2 veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se secó con aire templado a 60 °C durante 2 días dando el compuesto del título (62,9 mg) en forma de un polvo de color blanco.

(Procedimiento 2)

Después de suspender *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il}oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (55,7 mg) en agua (1,67 ml), se añadió ácido bromhídrico acuoso al 48% (0,010 ml) a temperatura ambiente para formar una solución acuosa. Se usó un baño de hielo seco/etanol para congelar la solución acuosa, después de que se liofilizara a presión reducida durante 27 horas dando el compuesto del título (70,7 mg) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,40-1,80 (6 H, m), 2,00-3,80 (16 H, m), 4,10-4,30 (2 H, m), 7,02 (1 H,

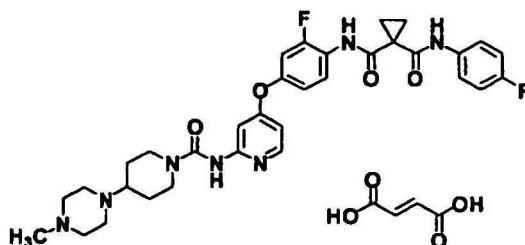
m), 7,07 (1 H, m), 7,10-7,20 (4 H, m), 7,40 (1 H, m), 7,58-7,62 (2 H, m), 8,08 (1 H, m), 8,26 (1 H, d, J = 6,4 Hz), 9,86 (1 H, s), 10,81 (1 H, s a).

(Ejemplo 1-3) Sulfato de N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida

- 5 Después de suspender N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (31,7 mg) en etanol (0,317 ml)-agua (0,0058 ml), se añadió ácido sulfúrico 2,5 M (0,010 ml) a temperatura ambiente para formar una solución. La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,158 ml, 2 veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se secó con aire templado a 60 °C durante 1 día dando el compuesto del título (26,5 mg) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,35 (2 H, m), 1,50-1,70 (4 H, m), 1,82 (2 H, m), 2,20-4,00 (14 H, m), 4,15 (2 H, m), 6,73 (1 H, m), 7,00-7,30 (6 H, m), 7,59-7,63 (2 H, m), 7,98 (1 H, m), 8,17 (1 H, m), 9,92 (1 H, s), 10,65 (1 H, s a).

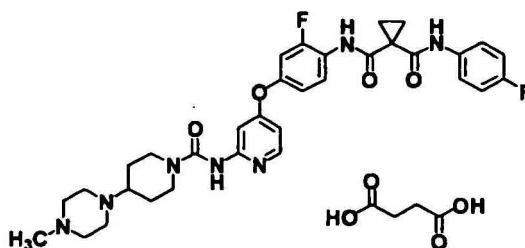
- 15 (Ejemplo 1-4) Fumarato de N-(2-Fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



- 20 Después de suspender N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (65,3 mg) en 2-propanol (0,653 ml), se añadió ácido fumárico (6,0 mg). La suspensión se soncó y después se agitó a 50 °C durante 5 minutos. Se añadió agua (0,0327 ml) y la agitación se continuó a la misma temperatura. Se añadieron 2-propanol (0,653 ml) y agua (0,0327 ml) y la agitación se continuó a la misma temperatura. Se añadió ácido fumárico (6,0 mg), y después de agitar a la misma temperatura para formar una solución, la mezcla se agitó adicionalmente durante una noche a temperatura ambiente. El precipitado se recogió por filtración en una atmósfera de nitrógeno. Después se secaron con aireación durante 2 horas dando el compuesto del título (26,0 mg, 34%) en forma de un polvo de color blanco.

- 25 Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,28 (2 H, m), 1,58 (4 H, m), 1,73 (2 H, m), 2,25 (3 H, s), 2,26-2,63 (9 H, m), 2,74 (2 H, m), 4,10 (2 H, m), 6,59 (2 H, s), 6,60 (1 H, m), 7,01 (1 H, m), 7,17 (2 H, m), 7,23 (1 H, m), 7,40 (1 H, d, J = 2,0 Hz), 7,59-7,63 (2 H, m), 7,93 (1 H, m), 8,13 (1 H, d, J = 5,6 Hz), 9,23 (1 H, s), 9,97 (1 H, m), 10,55 (1 H, m).

(Ejemplo 1-5) Succinato de N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida

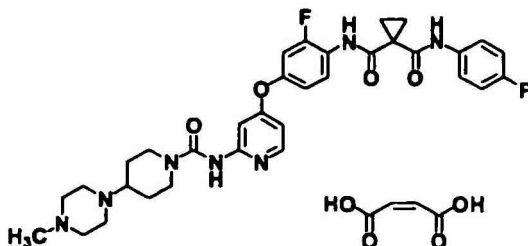


- 30 Después de suspender N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (31,7 mg) en etanol (0,317 ml), se añadió ácido succínico (5,7 mg) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,158 ml). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 30 minutos

y se secó adicionalmente con aire templado a 60 °C durante 4 horas dando el compuesto del título (12,0 mg, 32%) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,27 (2 H, m), 1,50-1,70 (4 H, m), 1,72 (2 H, m), 2,20 (4 H, s), 2,30-2,80 (14 H, m), 4,10 (2 H, m), 6,61 (1 H, m), 7,01 (1 H, m), 7,14-7,25 (3 H, m), 7,39 (1 H, m), 7,59-7,64 (2 H, m), 7,93 (1 H, m), 8,13 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 9,22 (1 H, s), 9,96 (1 H, m), 10,53 (1 H, s).

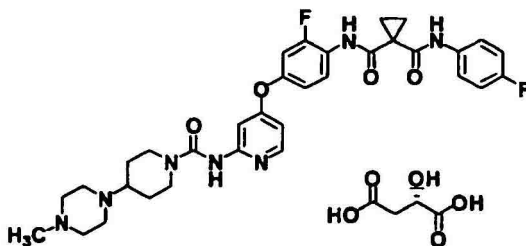
(Ejemplo 1-6) Maleato de *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



Después de suspender *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (65,3 mg) en acetona (1,306 ml), se añadió ácido maleico (12,0 mg). La suspensión se soncó y después se agitó a 50 °C durante 5 minutos para formar una solución. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se agitó a 4 °C durante 4 días. El precipitado se recogió por filtración en una atmósfera de nitrógeno. Después de lavar con acetona (0,020 ml), se secó con aireación a temperatura ambiente durante 2 horas dando el compuesto del título (15,1 mg, 20%) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,30 (2 H, m), 1,69 (4 H, m), 1,74 (2 H, m), 2,14-3,50 (14 H, m), 4,34 (2 H, m), 6,04 (2 H, s), 6,62 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 7,01 (1 H, m), 7,17 (2 H, m), 7,23 (1 H, m), 7,40 (1 H, s), 7,61 (2 H, m), 7,94 (1 H, m), 8,14 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 9,28 (1 H, s), 9,94 (1 H, m), 10,58 (1 H, m).

(Ejemplo 1-7) (2S)-Malato de *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



(Procedimiento 1)

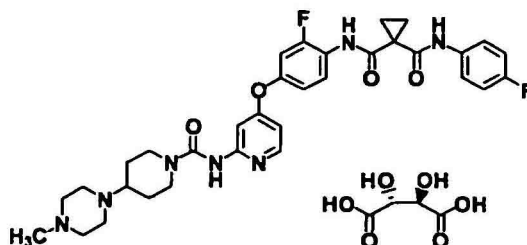
Se suspendió *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (31,4 mg) en etanol (0,317 ml). Se añadió ácido (2S)-málico (5,7 mg) a la suspensión a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a 50 °C para formar una solución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,158 ml, 2 veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se secó con aire templado a 60 °C durante 1 día dando el compuesto del título (26,0 mg, 68%) en forma de cristales blancos.

(Procedimiento 2)

Se disolvieron cristales de (2S)-malato de *N*-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (36,9 mg) en agua (0,740 ml). Se usó un baño de hielo seco/etanol para congelar la solución acuosa, después de que se liofilizara a presión reducida durante 67 horas dando el compuesto del título (34,2 mg, 93%) en forma de una sustancia amorfa blanca.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,29 (2 H, m), 1,50-1,70 (4 H, m), 1,74 (2 H, m), 2,20-2,80 (16 H, m), 4,03 (1 H, m), 4,12 (2 H, m), 6,61 (1 H, dd, $J = 2,4, 6,0$ Hz), 7,01 (1 H, m), 7,17 (2 H, m), 7,23 (1 H, m), 7,40 (1 H, d, $J = 2,4$ Hz), 7,59-7,63 (2 H, m), 7,93 (1 H, m), 8,13 (1 H, d, $J = 6,0$ Hz), 9,24 (1 H, s), 9,95 (1 H, m), 10,55 (1 H, s).

(Ejemplo 1-8) (2R, 3R)-tartrato de *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



(Procedimiento 1)

Se suspendió *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (63,4 mg) en acetona (1,268 ml), y se añadieron agua (0,1268 ml) y ácido *L*-(+)-tartárico (15 mg) a la suspensión. Después se agitó a 40 °C durante 5 minutos para formar una solución, que se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 23,5 horas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con acetona (1,0 ml). Después se secó durante 6,5 horas a temperatura ambiente dando el compuesto del título en forma de cristales incoloros (69,1 mg, 88%).

(Procedimiento 2)

Se suspendió *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (634 mg) en etanol (11,7 ml), y una solución 1 M de ácido *L*-(+)-tartárico en etanol (1,0 ml) se añadió a la suspensión. Después se calentó a 50 °C, se añadió agua (1,27 ml) y la mezcla se agitó a 50 °C durante 10 minutos para formar una solución. La solución se agitó durante 16 horas mientras se enfriaba a temperatura ambiente. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (2,0 ml). Después se secó con aireación a temperatura ambiente dando el compuesto del título (550 mg, 70%) en forma de cristales incoloros.

(Procedimiento 3)

Se cargó agua (1,20 ml) en una mezcla de *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (600 mg) y ácido *L*-(+)-tartárico (142 mg), y la mezcla se agitó. Tras confirmar la disolución, se añadió acetona (3,6 ml). Los cristales de siembra de (2R, 3R)-tartrato de *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida después se añadieron, la mezcla se agitó durante 1 hora y 30 minutos y se añadió acetona (2,4 ml) adicionalmente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 13 horas y 28 minutos, se añadió acetona (2,4 ml), la agitación se continuó durante 1 hora y 30 minutos, se añadió acetona (2,4 ml) adicionalmente y la agitación se continuó durante 5 horas y 32 minutos. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con un disolvente mixto de acetona y agua (9:1, 2 ml). Después se secó con aireación a temperatura ambiente dando el compuesto del título (673 mg, 90%) en forma de cristales incoloros.

(Procedimiento 4)

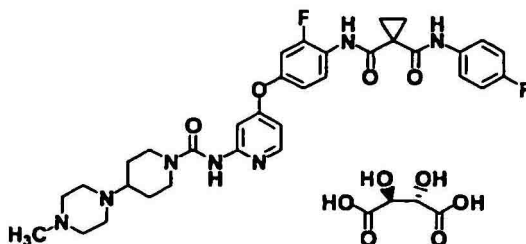
Se añadió agua (2,4 ml) a ácido *L*-(+)-tartárico (472 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de añadir acetona (8 ml) a la solución, se añadió *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (2 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta disolverla. Se añadieron agua (0,5 ml) y acetona (1,5 ml) a la solución, y después de añadir acetona adicional (8 ml), se añadieron cristales de siembra de (2R, 3R)-tartrato de *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (2 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. Después de añadir acetona (14 ml) y agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, los cristales se filtraron y se secaron dando el compuesto del título (2,22 g) en forma de cristales incoloros.

(Procedimiento 5)

Se disolvieron cristales de (2R, 3R)-tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (50 mg) en agua (2,5 ml). Se usó un baño de hielo seco/etanol para congelar la solución acuosa, después de que se liofilizara a presión reducida durante 30 horas dando el compuesto del título (44,2 mg, 88%) en forma de una sustancia amorfa blanca.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,29 (2 H, m), 1,68 (4 H, m), 1,74 (2 H, m), 2,35 (3 H, s), 2,40-2,70 (9 H, m), 2,77 (2 H, m), 4,07 (2 H, s), 4,12 (2 H, m), 6,61 (1 H, dd, $J = 2,4, 6,0$ Hz), 7,01 (1 H, m), 7,17 (2 H, m), 7,23 (1 H, m), 7,40 (1 H, d, $J = 2,4$ Hz), 7,59-7,63 (2 H, m), 7,92 (1 H, m), 8,14 (1 H, d, $J = 6,0$ Hz), 9,24 (1 H, s), 9,96 (1 H, m), 10,56 (1 H, s).

(Ejemplo 1-9) (2S,3S)-tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



Se añadió agua (1,44 ml) a ácido *D*-(-)-tartárico (284 mg) y la mezcla se disolvió a temperatura ambiente. Después se añadieron acetona (4,8 ml) y *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (1220 mg) mientras se agitaba a temperatura ambiente hasta disolverlo, y la agitación se continuó a temperatura ambiente durante 6 minutos. Se añadieron agua (0,3 ml) y acetona (5,7 ml) a la solución y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agitó después adicionalmente durante 1 hora mientras se enfriaba sobre hielo y durante 15 horas a 4 °C. Se añadió agua (1,5 ml) y la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se añadió acetona (5 ml) al residuo obtenido y la concentración a presión reducida se realizó dos veces. Después se añadió adicionalmente acetona (9,6 ml), y la mezcla se agitó a 4 °C durante 24 horas. Los cristales precipitados se recogieron por filtración y se lavaron con acetona (2,4 ml). Después se secaron dando el compuesto del título (1,36 g, 92%) en forma de cristales incoloros.

(Ejemplo de Producción 2-1) 1-(Benciloxi)-2,5-difluoro-4-nitrobenzono

A una solución de 2,4,5-trifluoronitrobenzono (9,48 g) y alcohol bencílico (5,54 ml) en *N,N*-dimetilformamida (40 ml) se le añadió carbonato potásico (11,1 g), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 horas. Se añadió agua (120 ml) a la mezcla de reacción a 0 °C y la mezcla se agitó a 4 °C durante 24 horas. Los cristales precipitados se recogieron por filtración y se lavaron con agua. Los cristales se secaron a presión reducida dando el compuesto del título (11,5 g, 81%) en forma de cristales de color amarillo pálido.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 5,35 (2 H, s), 7,40-7,50 (5 H, m), 7,64 (1 H, dd, $J = 7,2, 13,2$ Hz), 8,20 (1 H, dd, $J = 7,2, 10,8$ Hz).

(Ejemplo de Producción 2-2) 4-Amino-2,5-difluorofenol

A una solución de 1-(benciloxi)-2,5-difluoro-4-nitrobenzono (9,21 g) en metanol (300 ml) se le añadió paladio al 10% sobre carbono (921 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y 20 minutos en una atmósfera de hidrógeno. Después de terminar la reacción sustituyendo la atmósfera en el matraz con nitrógeno, el catalizador se filtró usando Celite. El filtrado se retiró por destilación a presión reducida dando el compuesto del título (4,96 g, 99%) en forma de un sólido pardo.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 4,67 (1 H, s), 6,53-6,64 (1 H, m), 9,03 (1 H, s).

(Ejemplo de Producción 2-3) 4-(4-Amino-2,5-difluorofenoxi)piridin-2-carboxiamida

Después de disolver 4-amino-2,5-difluorofenol (4,95 g) en dimetilsulfóxido (50 ml) en una atmósfera de nitrógeno, se añadió *tert*-butóxido potásico (4,05 g) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 25 minutos. Después de añadir 4-cloropiridin-2-carboxiamida (2,70 g) a la mezcla, la agitación se continuó a 80 °C durante 2,5 horas. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico (74,25 ml) y la agitación se continuó durante 10 horas. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó

con agua. El sólido se secó con aire templado a 100 °C durante 24 horas dando el compuesto del título (3,38 g, 74%) en forma de un polvo de color púrpura.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 5,57 (2 H, d, $J = 6,0$ Hz), 6,75-6,80 (1 H, m), 7,17-7,20 (1 H, m), 7,26 (1 H, dd, $J = 7,2, 10,8$ Hz), 7,38 (1 H, m), 7,73 (1 H, s), 8,14 (1 H, s), 8,52 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz).

5 ENI-EM (m/z): 288 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(Ejemplo de Producción 2-4) *N*-(4-([2-(Aminocarbonil)piridin-4-il]oxi)-2,5-difluorofenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-carboxiamida

Después de disolver ácido 1-(4-fluorofenilaminocarbonil)ciclopropanocarboxílico (1,35 g) en tetrahydrofurano (25,0 ml) en una atmósfera de nitrógeno, se añadió trietilamina (1,06 ml) gota a gota mientras se enfriaba en un baño de agua enfriada con hielo, y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Después se añadió cloruro de tionilo (0,439 ml) a la misma temperatura y la agitación se continuó durante 1,5 horas. Una mezcla de 4-(4-amino-2,5-difluorofenoxi)piridin-2-carboxiamida (1,0 g), tetrahydrofurano (12 ml) y trietilamina (1,06 ml) se añadió después gota a gota a la mezcla de reacción a la misma temperatura, y la agitación se continuó a 0 °C durante 24 horas y 45 minutos. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (70 ml) y una solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (15 ml). La fase orgánica se lavó dos veces con una solución acuosa 2 N de hidróxido sódico (15 ml), tres veces con una solución acuosa 1 N de ácido clorhídrico (15 ml) y una vez con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (10 ml) en ese orden, y después se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (Fuji Silysia NH, eluyente: heptano:acetato de etilo = 1:1 a 1:2, después acetato de etilo) y las fracciones que contenían el compuesto diana se concentraron a presión reducida. El residuo se secó después a presión reducida dando el compuesto del título (372,8 mg, 21%) en forma de un sólido de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,28-1,33 (4 H, m), 7,12-7,22 (2 H, m), 7,22-7,28 (1 H, m), 7,41 (1 H, d, $J = 2,4$ Hz), 7,59-7,67 (3 H, m), 7,75 (1 H, m), 8,10-8,17 (2 H, m), 8,56 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 9,80 (1 H, m), 11,02 (1 H, m).

25 (Ejemplo de Producción 2-5) *N*-(4-([2-(Aminopiridin-4-il]oxi)-2,5-difluorofenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida

Se disolvió *N*-(4-([2-(aminocarbonil)piridin-4-il]oxi)-2,5-difluorofenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (372,8 mg) en *N,N*-dimetilformamida (5,0 ml). Se añadieron agua (0,0713 ml), [bis(trifluoroacetoxi)iodo] benceno (679 mg) y piridina (0,384 ml) en ese orden a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (30 ml) y una solución acuosa 1 N de hidróxido sódico (9 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (Fuji Silysia NH, eluyente: heptano:acetato de etilo = 1:3, después acetato de etilo). Las fracciones que contenían el compuesto diana se concentraron a presión reducida y el residuo se secó a presión reducida dando el compuesto del título (301,0 mg, 86%) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,54-1,68 (4 H, m), 5,83 (1 H, d, $J = 2,4$ Hz), 5,99 (2 H, d, $J = 5,2$ Hz), 6,17 (1 H, dd, $J = 2,4, 5,6$ Hz), 7,16-7,20 (2 H, m), 7,47-7,53 (1 H, m), 7,57-7,62 (2 H, m), 7,81 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 8,02-8,10 (1 H, m), 9,77 (1 H, m), 10,99 (1 H, m).

ENI-EM (m/z): 443 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

40 (Ejemplo de Producción 2) *N*-(2,5-Difluoro-4-([2-((3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil)amino]piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida

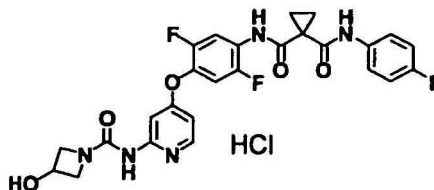
Después de disolver *N*-(4-([2-(aminopiridin-4-il]oxi)-2,5-difluorofenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-di-carboxiamida (100,0 mg) en tetrahydrofurano (1 ml) en una atmósfera de nitrógeno, se añadieron trietilamina (0,0630 ml) y cloroformiato de fenilo (0,0624 ml) gota a gota en ese orden a 0 °C y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Después se añadieron acetato de etilo (5 ml) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (5 ml) a la mezcla de reacción que después se agitó. La fase orgánica se separó, se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió después en *N,N*-dimetilformamida (1,0 ml). Después de añadir clorhidrato de 3-hidroxiazetidina (99,0 mg) y trietilamina (0,315 ml) a temperatura ambiente, la mezcla se agitó durante 22 horas y 5 minutos. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (10 ml) y una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (5 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se concentró a presión reducida. Después se añadieron acetato de etilo (1 ml) y heptano (1 ml) al residuo obtenido para precipitar un sólido, y el sólido se recogió por filtración. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (Fuji Silysia NH, eluyente: acetato de etilo, después acetato de etilo:metanol = 10:1) y las fracciones que contenían el compuesto diana se concentraron a

presión reducida dando el compuesto del título (71,1 mg, 58%) en forma de un polvo de color blanco.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,55-1,68 (4 H, m), 3,68 (2 H, dd, $J = 4,4, 8,4$ Hz), 4,10-4,14 (2 H, m), 4,34-4,40 (1 H, m), 5,60 (1 H, d, $J = 6,4$ Hz), 6,64 (1 H, dd, $J = 2,4, 5,6$ Hz), 7,15-7,20 (2 H, m), 7,50 (1 H, d, $J = 2,4$ Hz), 7,52-7,62 (3 H, m), 8,05-8,14 (1 H, m), 8,13 (1 H, d, $J = 5,6$ Hz), 9,20 (1 H, s), 9,81 (1 H, m), 10,99 (1 H, m).

5 ENI-EM (neg.)(m/z): 540 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

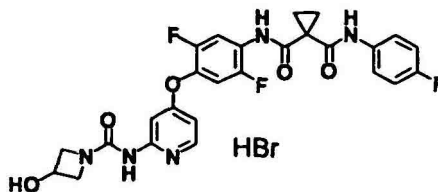
(Ejemplo 2-1) Clorhidrato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiacetidin-1-il)carbonil]amino}piridin-4-il)oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



10 Se suspendió *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiacetidin-1-il)carbonil]amino}piridin-4-il)oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (32,5 mg) en acetona (0,325 ml). Se añadió ácido clorhídrico 5 N (0,012 ml) a temperatura ambiente. Después de añadir agua (0,151 ml), la mezcla se calentó y se agitó a 50 °C durante 5 minutos para formar una solución. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió acetona (0,325 ml), y la agitación se continuó durante 26 horas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con acetona (0,163 ml, dos veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora y después se
15 secó con aire templado a 60 °C durante 12 horas dando el compuesto del título (27,6 mg, 80%) en forma de cristales blancos.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,50-1,80 (4 H, m), 3,50-4,30 (4 H, m), 4,45 (1 H, m), 7,02 (1 H, m), 7,10-7,25 (3 H, m), 7,55-7,65 (2 H, m), 7,68 (1 H, m), 8,18 (1 H, dd, $J = 7,2, 12,0$ Hz), 8,25 (1 H, d, $J = 6,4$ Hz), 9,78 (1 H, s), 10,29 (1 H, a), 11,20 (1 H, s a).

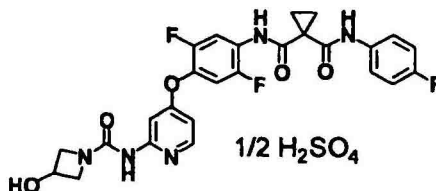
20 (Ejemplo 2-2) Bromhidrato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiacetidin-1-il)carbonil]amino}piridin-4-il)oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



25 Se suspendió *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiacetidin-1-il)carbonil]amino}piridin-4-il)oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (32,5 mg) en etanol (0,325 ml). Después de añadir ácido bromhídrico acuoso al 48% (0,010 ml) a temperatura ambiente para formar una solución, se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,163 ml, dos veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora y después se secó con aire templado a 60 °C durante 12 horas dando el compuesto del título (30,7 mg, 82%) en forma de cristales blancos.

30 Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,50-1,75 (4 H, m), 3,50-4,30 (4 H, m), 4,45 (1 H, m), 7,00 (1 H, m), 7,08 (1 H, m), 7,16-7,21 (2 H, m), 7,55-7,65 (2 H, m), 7,68 (1 H, m), 8,17 (1 H, dd, $J = 7,2, 12,0$ Hz), 8,23 (1 H, d, $J = 6,8$ Hz), 9,76 (1 H, s), 10,02 (1 H, a), 11,17 (1 H, s a).

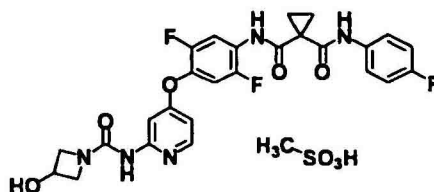
(Ejemplo 2-3) 1/2 Sulfato de N-[2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiacetidin-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il)oxi]fenil}-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



Se suspendió *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidin-1-il)carbonil]amino}piridin-4-il)oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (32,5 mg) en etanol (0,325 ml). Después de añadir ácido sulfúrico 2,5 M (0,012 ml) a temperatura ambiente para formar una solución, se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,163 ml, dos veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora y después se secó con aire templado a 60 °C durante 12 horas dando el compuesto del título (31,2 mg, 88%) en forma de cristales blancos.

10 Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 1,50-1,75 (4 H, m), 3,50-4,25 (4 H, m), 4,43 (1 H, m), 6,92 (1 H, m), 7,10-7,30 (3 H, m), 7,50-7,70 (3 H, m), 8,15 (1 H, dd, $J = 6,8, 12,0$ Hz), 8,21 (1 H, d, $J = 6,4$ Hz), 9,77 (1 H, s), 11,13 (1 H, s a).

(Ejemplo 2-4) Metanosulfonato de N-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidin-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil}-N'-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



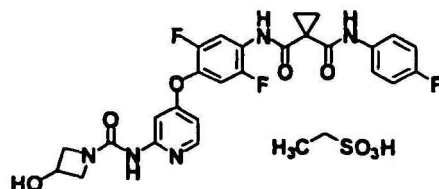
Se suspendió *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidin-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il)oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (30,0 mg) en etanol (0,300 ml). Después de añadir ácido metanosulfónico (0,004 ml) a temperatura ambiente para formar una solución, se agitó a temperatura ambiente durante 90 horas y 50 minutos. Se añadió etanol (1 ml), y después el precipitado se recogió por filtración y se lavó con *tert*-butil metil éter (1 ml, tres veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora dando el compuesto del título (26,3 mg, 75%) en forma de cristales blancos.

(Procedimiento 2)

Se añadieron agua (1,0 ml) y *tert*-butanol (1,0 ml) a cristales de metanosulfonato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino]piridin-4-il)oxil]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (50,0 mg) a temperatura ambiente durante la disolución. Se usó un baño de hielo seco/etanol para congelar la solución, después de que se liofilizara a presión reducida durante 6 días dando el compuesto del título (47,1 mg, 94%) en forma de una sustancia amorfa blanca.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,52-1,76 (4 H, m), 2,31 (3 H, s), 3,70-3,84 (2 H, m), 4,15-4,30 (2 H, m), 4,41-4,50 (1 H, m), 6,96-7,12 (2 H, m), 7,14-7,25 (2 H, m), 7,55-7,63 (2 H, m), 7,64-7,76 (1 H, m), 8,18 (1 H, dd, $J = 7,2, 12,0$ Hz), 8,26 (1 H, d, $J = 6,8$ Hz), 9,75 (1 H, s), 10,12 (1 H, s a), 11,19 (1 H, s a).

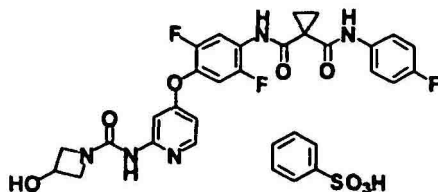
(Ejemplo 2-5) Etanosulfonato de *N*-[2,5-difluoro-4-[(2-[[[3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il)oxi]fenil]-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



Se suspendió *N*-[2,5-difluoro-4-[(2-[[[3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il)oxi]fenil]-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (32,5 mg) en etanol (0,325 ml). Después de añadir ácido etanosulfónico (0,006 ml) a temperatura ambiente para formar una solución, se agitó a temperatura ambiente durante 25 horas. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con etanol (0,163 ml, 2 veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora y se secó con aire templado a 60 °C durante 12 horas dando el compuesto del título (25,5 mg, 65%) en forma de cristales blancos.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,05 (3 H, t, $J = 7,2$ Hz), 1,50-1,75 (4 H, m), 2,37 (2 H, c, $J = 7,2$ Hz), 3,70-4,30 (4 H, m), 4,44 (1 H, m), 6,99 (1 H, m), 7,11 (1 H, m), 7,15-7,25 (2 H, m), 7,55-7,63 (2 H, m), 7,67 (1 H, m), 8,17 (1 H, dd, $J = 7,2, 12,0$ Hz), 8,24 (1 H, d, $J = 6,8$ Hz), 9,76 (1 H, s), 9,96 (1 H, a), 11,16 (1 H, s a).

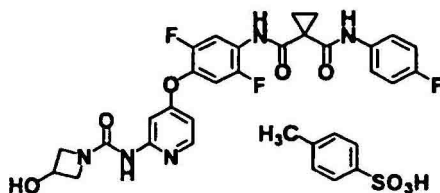
(Ejemplo 2-6) Bencenosulfonato de *N*-[2,5-difluoro-4-[(2-[[[3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il)oxi]fenil]-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



Se suspendió *N*-[2,5-difluoro-4-[(2-[[[3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il)oxi]fenil]-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (31,6 mg) en etanol (0,316 ml). Después de añadir ácido bencenosulfónico (10,2 mg) a temperatura ambiente para formar una solución, se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas y 50 minutos. Se añadió etanol (0,5 ml), y después el precipitado se recogió por filtración y se lavó con *tert*-butil metil éter (1 ml, tres veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora dando el compuesto del título (30,4 mg, 74%) en forma de cristales blancos.

Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,55-1,72 (4 H, m), 3,70-3,81 (2 H, m), 4,15-4,26 (2 H, m), 4,40-4,49 (1 H, m), 7,00 (1 H, m), 7,08 (1 H, m), 7,14-7,23 (2 H, m), 7,28-7,35 (3 H, m), 7,55-7,63 (4 H, m), 7,67 (1 H, dd, $J = 7,2, 10,0$ Hz), 8,13-8,22 (1 H, m), 8,24 (1 H, d, $J = 6,4$ Hz), 9,75 (1 H, s), 10,01 (1 H, s a), 11,17 (1 H, s a).

(Ejemplo 2-7) 4-Metilbencenosulfonato de *N*-[2,5-difluoro-4-[(2-[[[3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil]amino]piridin-4-il)oxi]fenil]-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida



(Procedimiento 1)

- Se suspendió *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (34,2 mg) en etanol (0,342 ml). Se añadió ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (13,2 mg) a temperatura ambiente para formar una solución, que después se agitó a temperatura ambiente durante 90 horas y 25 minutos. Se añadió etanol (1 ml), y el precipitado se recogió por filtración y se lavó con *terc*-butil metil éter (1 ml, tres veces). Después se secó con aireación a temperatura ambiente durante 1 hora dando el compuesto del título (33,0 mg, 73%) en forma de cristales blancos.

(Procedimiento 2)

- Se añadieron agua (6,0 ml) y *terc*-butanol (6,0 ml) a los cristales de 4-metilbencenosulfonato de *N*-{2,5-difluoro-4-[(2-[(3-hidroxiazetidín-1-il)carbonil]amino)piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida (50,0 mg) para su disolución. Se usó un baño de hielo seco/etanol para congelar la solución, después de que se liofilizara a presión reducida durante 6 días dando el compuesto del título (45,1 mg, 90%) en forma de una sustancia amorfa blanca.

- Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm): 1,55-1,72 (4 H, m), 2,29 (3 H, s), 3,70-3,84 (2 H, m), 4,14-4,26 (2 H, m), 4,40-4,49 (1 H, m), 7,01 (1 H, m), 7,07 (1 H, m), 7,11 (2 H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,15-7,24 (2 H, m), 7,47 (2 H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,55-7,64 (2 H, m), 7,64-7,72 (1 H, m), 8,13-8,21 (1 H, m), 8,24 (1 H, d, $J = 6,8$ Hz), 9,75 (1 H, s), 10,04 (1 H, s a), 11,17 (1 H, s a).

(Medición de la difracción de rayos X en polvo)

- Los cristales obtenidos en los Ejemplos 1-7 (Procedimiento 1), 1-8 (Procedimiento 1), 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 (Procedimiento 1), 2-5, 2-6 y 2-7 (Procedimiento 1) y las sustancias amorfas obtenidas en los Ejemplos 1-7 (Procedimiento 2), 1-8 (Procedimiento 5), 2-4 (Procedimiento 2) y 2-7 (Procedimiento 2) en cantidades de muestra de aproximadamente 5 mg se molieron en un mortero y después se pusieron en un recipiente de medición de aluminio para realizar la medición en las siguientes condiciones.

Aparato: sistema DSC de rayos X: TTR-III (fabricado por Rigaku Denki KK)

- rayos X: rayos $\text{CuK}\alpha$

Goniómetro: goniómetro TTR-III horizontal

Contador: contador de centelleo

Tensión del tubo: 50 kV

Corriente del tubo: 300 mA

- Velocidad de exploración: 5 °/min

Eje de exploración: 2θ

Intervalo de exploración: $2\theta =$ de 5° a 35°

Rendija de divergencia: 0,5°

Rendija limitada de divergencia vertical: 2 mm

- Rendija de dispersión: abierta

Rendija de recepción: abierta

Anchura de muestreo: 0,02°

Repetición del recuento: 1

- La difracción de rayos X en patrones de polvo para los cristales obtenidos en los Ejemplos 1-7 (Procedimiento 1), 1-8 (Procedimiento 1), 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 (Procedimiento 1), 2-5, 2-6 y 2-7 (Procedimiento 1) y las sustancias amorfas obtenidas en los Ejemplos 1-7 (Procedimiento 2), 1-8 (Procedimiento 5), 2-4 (Procedimiento 2) y 2-7 (Procedimiento 2) se muestran en las Figs. 1 a 13, y los picos representativos a ángulos de difracción (2θ) y las intensidades relativas para cada uno de los cristales se muestran en las Tablas 1 a 9.

[Tabla 1]

2θ	Intensidad relativa
10,8	37
12,3	57
14,3	49
17,7	100
19,0	90
19,7	61
21,7	54
22,0	35
23,5	69
24,7	40

[Tabla 2]

2θ	Intensidad relativa
10,7	36
12,2	59
14,3	39
17,7	100
19,0	84
19,6	55
21,4	45
22,1	43
23,4	60
24,8	46

[Tabla 3]

2θ	Intensidad relativa
7,4	29
10,3	100
12,0	38
13,9	37
15,0	40
16,5	37
24,7	69
25,1	78
25,9	50
26,6	39

[Tabla 4]

26	Intensidad relativa
8,3	21
10,4	75
12,2	22
14,0	34
16,2	37
17,7	30
26	Intensidad relativa
19,5	63
20,4	35
25,3	100
28,0	34

[Tabla 5]

2θ	Intensidad relativa
6,5	98
6,9	73
9,3	100
16,0	54
18,7	46

19,5	68
22,0	71
22,9	45
23,9	55
26,7	40

[Tabla 6]

2θ	Intensidad relativa
7,9	34
9,9	41
13,9	53
17,7	69
19,1	55
20,4	85
21,7	82
22,4	48
23,3	100
25,8	41

[Tabla 7]

2θ	Intensidad relativa
6,7	100
10,1	41
12,7	17
13,7	15
16,9	38
18,5	42
19,4	27
21,5	34
22,1	35
23,4	15

[Tabla 8]

2θ	Intensidad relativa
7,8	100
8,3	87
8,8	58
13,7	36
17,4	63
18,5	74
19,7	63
20,8	51
24,3	36
24,6	38

[Tabla 9]

2θ	Intensidad relativa
7,2	86
13,4	43
17,3	59
18,8	29
19,3	37
20,6	53
20	Intensidad relativa
21,1	42
23,6	100
24,6	58
26,1	51

(Análisis espectral de RMN de ^{13}C en estado sólido)

- 5 El análisis espectral de RMN de ^{13}C en estado sólido de los cristales obtenidos en el Ejemplo 1-8 (Procedimiento 4) se realizó en las siguientes condiciones.

Aparato de medición: AVANCE 400 MHz (Bruker)

Sonda: 7 mm-CP/MAS (Bruker)

Diámetro de celda RMN: 7 mm

- 10 Velocidad de giro de celda: 5000 rotaciones/s

Procedimiento de medición: CPTOSS

Núcleo observado: ^{13}C (frecuencia de resonancia: 100,6248425 MHz)

Tiempo de latencia: 3 segundos

Tiempo de contacto: 1000 microsegundos

Número de integración: 5910

- 5 Patrón externo: el desplazamiento químico para el carbono del carbonilo de glicina se ajustó como 176,03 ppm.

La Fig. 14 muestra el espectro de RMN de ^{13}C en estado sólido para los cristales obtenidos en el Ejemplo 1-8 (Procedimiento 4), y la Tabla 10 muestra los desplazamientos químicos.

[Tabla 10]

Desplazamiento químico (ppm)		
180,5	122,5	61,2
179,5	120,8	52,1
175,7	119,7	49,0
172,1	115,4	46,8
166,7	114,4	45,7
157,1	109,4	43,3
154,9	97,1	41,5
151,1	75,6	28,7
148,1	74,8	28,0
135,2	73,6	26,9
125,4	63,6	20,8

- 10 [Ejemplos de Ensayo Farmacológico]

La actividad biológica y el efecto farmacéutico (actividad inhibidora para el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, actividad anti-tumoral, actividad inhibidora para angiogénesis, y actividad inhibidora para metástasis del cáncer) de los compuestos 1 y 2 se evaluaron por los procedimientos descritos a continuación.

Las abreviaturas y términos usados en los siguientes Ejemplos de Ensayo Farmacológico se muestran como sigue:

- 15 (Lista de Abreviaturas)

HGFR (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)

ADN (ácido desoxirribonucleico)

Placenta humana (placenta humana)

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

- 20 VEGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular)

FGFR1 (receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos)

PDGFR β (receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas)

EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

FBS (suero bovino fetal)

PBS (solución salina tamponada con fosfato)

Tris (Tris(hidroximetil)aminometano, (tampón) Tris)

PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

NP-40 (Nonidet P-40)

5 EGTA (ácido O,O-bis(2-aminoetilenglicol)-N,N,N',N'-tetraacético)

SDS (dodecil sulfato sódico)

BSA (albúmina de suero bovina)

Hepes (ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico], (tampón) Hepes)

ATP (Adenosina 5'-trifosfato)

10 EDTA (ácido etilendiamina tetraacético)

HTRF (fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea)

HRP (peroxidasa de rábano rusticano)

ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)

Ejemplo de Ensayo Farmacológico 1: actividad inhibidora contra la actividad del receptor de tirosina quinasa

15 1. Clonación del receptor tirosina quinasas, y preparación de las soluciones de baculovirus recombinantes

El dominio citoplásmico de HGFR (Nº Acceso GenBank J02958) es un fragmento de ADN de 1,3 kb que comienza con Lys974 y que incluye un codón de parada, y que han descrito Park et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84(18), 6379-6383, 1987). El fragmento de ADN se aisló de la biblioteca de ADNc de placenta humana (adquirida en Clontech) por PCR (TaKaRa Ex Taq™ Kit, adquirida en TaKaRa) usando dos clases de cebadores (SEC ID Nº: 1, 5'-CCGGCCGGATCCAAAAGA-GAAAGCAAATTAATAA-3' y SEC ID Nº: 2, 5'-TTAATTCTGCAGCTATGATGTCTCCCAGAAGGA-3', adquiridos en Invitrogen). El fragmento de ADN se clonó en un vector de transfección de baculovirus (pFastBac™-HT (adquirido en GIBCO BRL)) para producir una construcción recombinante. La construcción se transfectó en células de insecto (*Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9)) para producir una solución de baculovirus transfectado con HGFR (la preparación de un baculovirus recombinante puede encontrarse en el texto convencional (Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (GIBCO BRL)). La clonación de otras tirosina quinasas receptoras y la preparación de las soluciones de baculovirus recombinantes se prepararon usando un fragmento citoplásmico partiendo de Lys791 (VEGFR2, Nº Acceso GenBankL04947), a fragmento citoplásmico partiendo de Lys398 (FGFR1, Nº Acceso Gen-Bank. X52833) y un fragmento citoplásmico partiendo de Lys558 (PDGFRp, Nº Acceso GenBank M21616) en lugar de HGFR en el procedimiento anterior. EGFR se adquirió en Sigma (Nº Producción E-2645).

2. Expresión y purificación de tirosina quinasas receptoras

A la suspensión de células Sf9 (3×10^8 células) en medio SF-900II (adquirido en Invitrogen) que contenía FBS al 2% se le añadió una solución de baculovirus transfectado con HGFR anterior (4 ml), seguido de agitación del cultivo a 27 °C durante 48 h. Las células infectadas con el baculovirus transfectado con HGFR se centrifugaron a 1.000 rpm, 4 °C durante 5 min para retirar el sobrenadante. Las células infectadas precipitadas se suspendieron en 80 ml de PBS enfriado con hielo, y se centrifugaron a 1.000 rpm, 4 °C durante 5 min para retirar el sobrenadante. Las células infectadas precipitadas se suspendieron en 40 ml de tampón de lisis enfriado con hielo (Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), 2-mercaptoetanol 5 mM, KCl 100 mM, PMSF 1 mM y 1% (v/v) de NP-40). La suspensión se centrifugó a 12.000 rpm, 4 °C durante 30 min para proporcionar un sobrenadante.

El sobrenadante se cargó en una columna de agarosa Ni-NTA (3 ml, adquirida en Qiagen) equilibrada con 30 ml de Tampón A (Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), 2-mercaptoetanol 5 mM, KCl 20 mM, imidazol 20 mM y 10% (v/v) de glicerol). La columna se lavó con 30 ml de Tampón A, 6 ml de Tampón B (Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), 2-mercaptoetanol 5 mM, KCl 1 M, y 10% (v/v) de glicerol) y 6 ml de Tampón A en este orden. Después, la columna se eluyó con 6 ml de Tampón C (Tris-HCl 20 mM (pH 8,5), 2-mercaptoetanol 5 mM, KCl 100 mM, imidazol 100 mM, y 10% (v/v) de glicerol) para proporcionar una fracción. La fracción quedó atrapada en una membrana de diálisis (adquirida en Spectrum Laboratories), se dializó a 4 °C durante una noche con 1 l de tampón de diálisis (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), 10% (v/v) de glicerol, ditiotritol 1 mM, Na_3VO_4 0,1 mM y EGTA 0,1 mM), y se almacenó a -80 °C hasta que se usó. Una alícuota de la fracción dializada se sometió a electroforesis SDS, y después una proteína recombinante (His6-

HGFR, el dominio citoplásmico HGFR condensado con seis histidinas en el extremo N) detectada a un peso molecular de aproximadamente 60 kDa cuando se tiñó con Azul Brillante de Coomassie, se determinó con respecto a contenido de proteína usando BSA (adquirida en Sigma) como patrón. El dominio citoplásmico VEGFR2, el dominio citoplásmico FGFR1, y el dominio citoplásmico PDGFR β se condensaron con seis histidinas en el extremo N mediante un procedimiento similar para producir las proteínas recombinantes respectivas (His6-VEGFR2, His6-FGFR1, y His6-PDGFR β).

3. Ensayo para la actividad inhibidora contra actividad HGFR tirosina quinasa

A cada pocillo de una placa redonda de 96 pocillos (adquirida en NUNC, N° de Producción 163320) se le añadieron 10 μ l de una solución para reacción de quinasa (Hepes 200 mM (pH 7,4), MgCl₂ 80 mM, MnCl₂ 16 mM y Na₃VO₄ 2 mM), 250 ng de poli(Glu4: Tyr1) biotinilado (biotina-poli(GT), adquirida en Japan Schering) (6 μ l, diluido 15 veces con agua destilada), 30 ng de His6-HGFR (10 μ l, diluido 60 veces con BSA al 0,4%) y una sustancia de ensayo disuelta en dimetilsulfóxido (4 μ l, diluida 100 veces con BSA al 0,1%) para conseguir 30 μ l. Se añadieron al pocillo 10 μ l de ATP 4 μ M (adquirido en Sigma) diluido con agua destilada para incubarlo a 30 °C durante 10 min, seguido de adición de 10 μ l de EDTA 500 mM (pH 8,0) (adquirido en Wako Pure Chemicals) para proporcionar una solución de reacción con quinasa.

La biotina-poli(GT) fosforilada con tirosina se detectó usando el procedimiento de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo Homogénea (HTRF) (Analytical Biochemistry, 269, 94-104,1999). Es decir, a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de semi-área negra (adquirida en COSTAR, N° de Producción 3694) se le añadieron 20 μ l de la solución anterior de reacción con quinasa y 30 μ l de una solución de dilución (Hepes 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 4 mM, Na₃VO₄ 0,5 mM, BSA al 0,1% y EDTA 100 mM). Se añadieron al pocillo 7,5 ng de un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con criptato de europio (Eu(K)-PY20, adquirido en Japan Schering) (25 μ l, diluido 250 veces con Hepes 20 mM (pH 7,0), KF 0,5 M y BSA al 0,1%) y 250 ng de estreptavidina marcada con XL665 (XL665-SA, adquirida en Japan Schering) (25 μ l, diluida 62,5 veces con Hepes 20 mM (pH 7,0), KF 0,5 M y BSA al 0,1%), y usando un analizador de microplacas discovery HTRF (Packard), el pocillo se irradió instantáneamente a una longitud de onda de excitación de 337 nm para determinar las intensidades de fluorescencia a 665 nm y 620 nm. La tasa de fosforilación de tirosina de una biotina-poli(GT) se calculó usando un valor delta F% descrito en el texto de un procedimiento experimental convencional con HTRF de Japan Schering. Aunque se define el valor delta F% de un pocillo al que se ha añadido His6-HGFR y sin sustancia de ensayo como el 100% y el valor delta F% de un pocillo al que no se le ha añadido His6-HGFR ni sustancia de ensayo como el 0%, se calculó la proporción (%) del valor delta F% de cada pocillo al que se había añadido la sustancia de ensayo. La proporción (%) se usó para calcular la concentración (Cl₅₀) de la sustancia de ensayo necesaria para inhibir la actividad de HGFR quinasa en un 50%. La Cl₅₀ del compuesto 1 era de 0,053 μ M y la Cl₅₀ del compuesto 2 era de 0,004 μ M.

4. Ensayo para la actividad inhibidora contra las actividades de tirosina quinasa receptoras distintas de HGFR

La actividad inhibidora contra las actividades de tirosina quinasa de VEGFR2, FGFR1, y EGFR se determinaron de una manera similar a la del ensayo para la actividad inhibidora contra la actividad de HGFR tirosina quinasa descrito anteriormente, usando 15 ng de His6-VEGFR2, 15 ng de His6-FGFR1 o 23ng de EGFR, respectivamente, en lugar de HGFR. La actividad inhibidora contra la actividad de tirosina quinasa PDGFR β se evaluó obteniendo una solución de reacción con quinasa por el procedimiento anterior, usando 50 ng de His6-PDGFR β , seguido de la detección de la biotina-poli(GT) fosforilada con tirosina por un procedimiento descrito a continuación.

A cada pocillo de una placa de 96 pocillos revestida con estreptavidina (adquirida en PIERCE, N° de Producción 15129) se le añadieron 34 μ l de la solución de reacción con quinasa y 16 μ l de una solución de dilución, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 30 min. Después, el pocillo se lavó tres veces con 150 μ l de una solución de lavado (Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,05% y BSA al 0,1%), y se añadieron al pocillo 70 μ l de conjugado anti-fosfotirosina (PY20)-HRP (adquirido en Transduction Laboratories, N° de Producción P-11625) (diluido 2.000 veces con Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,05% y BSA al 1%), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 h. Después, cada pocillo se lavó tres veces con 150 μ l de la solución de lavado, y se suministró con 100 μ l de Sustrato de Peroxidasa de Membrana TMB (adquirido en Funakoshi, N° de Producción 50-5077-03). Después de incubarlo a temperatura ambiente durante 10 min, se añadieron 100 μ l de ácido fosfórico 1 M a cada pocillo, y se usó un Lector de Placas MTP-500 (Corona Electric), la absorbancia del pocillo se determinó instantáneamente a 450 nm. Aunque se define la absorbancia de un pocillo al que se ha suministrado His6-PDGFR β y nada de sustancia de ensayo como el 100% y la absorbancia de un pocillo al que se ha suministrado nada de His6-PDGFR β y nada de sustancia de ensayo como el 0%, se calculó la proporción de absorbancia (%) de cada pocillo al que se había suministrado la sustancia de ensayo. La proporción de absorbancia (%) se usó para calcular la concentración (Cl₅₀) de la sustancia de ensayo necesaria para inhibir la actividad de quinasa PDGFR β en un 50%.

Ejemplo de Ensayo Farmacológico 2: actividad inhibidora contra la proliferación de células cancerosas gástricas humanas (MKN-45)

Las células cancerosas gástricas humanas (MKN-45) se suspendieron en un medio RPMI1640 que contenía FBS al 1% (adquirido en Sigma). La suspensión celular (1×10^4 células/ml) se añadió en una placa de 96 pocillos para el cultivo celular (adquirida en NUNC, N° de Producción 167008) a 0,1 ml/pocillo, y después se cultivó en una incubadora al 5% de CO₂ (37 °C) durante una noche. Después del cultivo, cada pocillo se suministró con 0,1 ml de una sustancia de ensayo diluida con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 1%, seguido de cultivo en una incubadora al 5% de CO₂ (37 °C) durante 3 días. Después del cultivo, cada pocillo se suministró con 10 µl de Kit de Recuento Celular-8 (adquirido en DOJINDO, N° de Producción 343-07623), seguido de incubación en una incubadora al 5% de CO₂ (37 °C) durante aproximadamente 1,5 h. Después de la incubación, usando el Lector de Placas MTP-500 (Corona Electric), la absorbancia de cada pocillo se determinó a una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 660 nm. Se calculó la proporción (%) de absorbancia de cada pocillo suministrado con una sustancia de ensayo a absorbancia del pocillo suministrado con nada de sustancia de ensayo, y la proporción se usó para calcular la concentración (CI₅₀) de la sustancia de ensayo necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50%. La CI₅₀ del compuesto 1 era de 0,017 µM y la CI₅₀ del compuesto 2 era de 0,005 µM.

Ejemplo de Ensayo Farmacológico 3: actividad inhibidora contra la auto-fosforilación de HGFR usando ELISA

1. Preparación de extracto celular

Se suspendieron células cancerosas gástricas humanas (MKN-45) en un medio RPMI1640 que contenía FBS al 1% (adquirido en Sigma). La suspensión celular (1×10^5 células/ml) se puso en una placa de 96 pocillos para el celular (adquirida en NUNC, N° de Producción 167008) a 0,1 ml/pocillo, y después se cultivó en una incubadora al 5% de CO₂ (37 °C) durante una noche. Después del cultivo, se retiró de cada pocillo la solución sobrenadante, seguido de adición de 0,05 ml de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 1%. Después, el pocillo se suministró con 0,05 ml de la sustancia de ensayo disuelta en dimetilsulfóxido (diluido con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 1%), seguido de cultivo en una incubadora al 5% de CO₂ (37 °C) durante 1 h. Se retiró de cada pocillo el sobrenadante, y cada pocillo se lavó con 150 µl de PBS, seguido de adición de 100 µl de un tampón de lisis (Hepes 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, 10% (v/v) de glicerol, Triton X-100 al 1%, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), NaF 100 mM, PMSF 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 50 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina A y Na₃VO₄ 1 mM). La placa se agitó a 4 °C durante 1 h para preparar el extracto celular.

2. Preparación de una placa con anticuerpo anti-fosfotirosina inmovilizado

A una placa de 96 pocillos para ELISA (adquirida en COSTAR, N° de Producción 3369) se le añadieron 50 µl de tampón bicarbonato 60 mM (pH 9,6) que contenía 50 µg/ml de un anticuerpo anti-fosfotirosina (PY20, adquirido en Transduction Laboratory, N° de Producción P-11120). La placa se incubó a 4 °C durante una noche.

3. Ensayo para la actividad inhibidora contra auto-fosforilación de HGFR

Cada pocillo de la placa preparado en el apartado 2, se lavó tres veces con 200 µl de PBS, y se suministró con 150 µl de BSA al 3%/PBS, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 h. Cada pocillo se lavó tres veces con 200 µl de PBS, y se suministró con 50 µl del extracto celular anterior, seguido de incubación a 4 °C durante una noche. Después de la incubación, cada pocillo se lavó tres veces con 250 µl de una solución de lavado (BSA al 0,1%, Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM, y Tween-20 al 0,05%), y se suministró con 70 µl de anticuerpo anti-HGFR (h-Met(C-12), adquirido en Santa Cruz, N° de Producción Sc-10) diluido 2.000 veces con una solución de reacción (BSA al 1%, Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,05%), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 h. El pocillo se lavó tres veces con 250 µl de la solución de lavado, y se suministró con 70 µl de anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (adquirido en Cell Signaling, N° de Producción 7074) diluido 2.000 veces con la solución de reacción, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 1 h. Cada pocillo se lavó tres veces con 250 µl de la solución de lavado, y se suministró con 70 µl de Sustrato de Peroxidasa de Membrana TMB (adquirido en Funakoshi, N° de Producción 50-5077-03), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Cada pocillo se suministró con 70 µl de ácido fosfórico 1 M, y usando el Lector de Placas MTP-500 (Corona Electric), se determinó la absorbancia del pocillo instantáneamente, a una longitud de onda de medición de 450 nm. Aunque se define la absorbancia de un pocillo al que se ha suministrado el extracto celular que no tiene sustancia de ensayo como el 100% de actividad de auto-fosforilación de HGFR, y la absorbancia de un pocillo al que se ha suministrado 50 µl del tampón de lisis como el 0% de actividad de auto-fosforilación de HGFR, el (%) de actividad de auto-fosforilación de HGFR se calculó para cada pocillo. La concentración de la sustancia de ensayo se cambió varios niveles para calcular las actividades de auto-fosforilación de HGFR (%) en los casos respectivos, y para calcular la concentración (CI₅₀) de la sustancia de ensayo necesaria para inhibir actividad de auto-fosforilación de HGFR en un 50%. La CI₅₀ del compuesto 1 era de 0,016 µM y la CI₅₀ del compuesto 2 era de 0,0084 µM.

Aplicabilidad industrial

5 Las sales de los derivados de fenoxipiridina y sus cristales de acuerdo con la invención tienen excelentes propiedades físicas y son útiles como agentes antitumorales, inhibidores de angiogénesis e inhibidores para metástasis para diversos tipos de tumores, incluyendo un cáncer pancreático, un cáncer gástrico, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer de riñón, un tumor cerebral y un cáncer de ovarios.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eisai R&D Manamgement Co., Ltd.

10 <120> SAL DE UN DERIVADO DE FENOXIPIRIDINA, O UN CRISTAL DE LA MISMA, Y PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN

<130> FP07-0062-01

<150>JP 2007-036690

<151> 2007-02-16

<150> US 60/890.769

15 <151 > 2007-02-20

<160> 2

<170> Versión PatentIn 3.1

<210>1

<211> 33

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 1

25 ccggccggat ccaaaaagag aaagcaaatt aaa 33

<210> 2

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 2

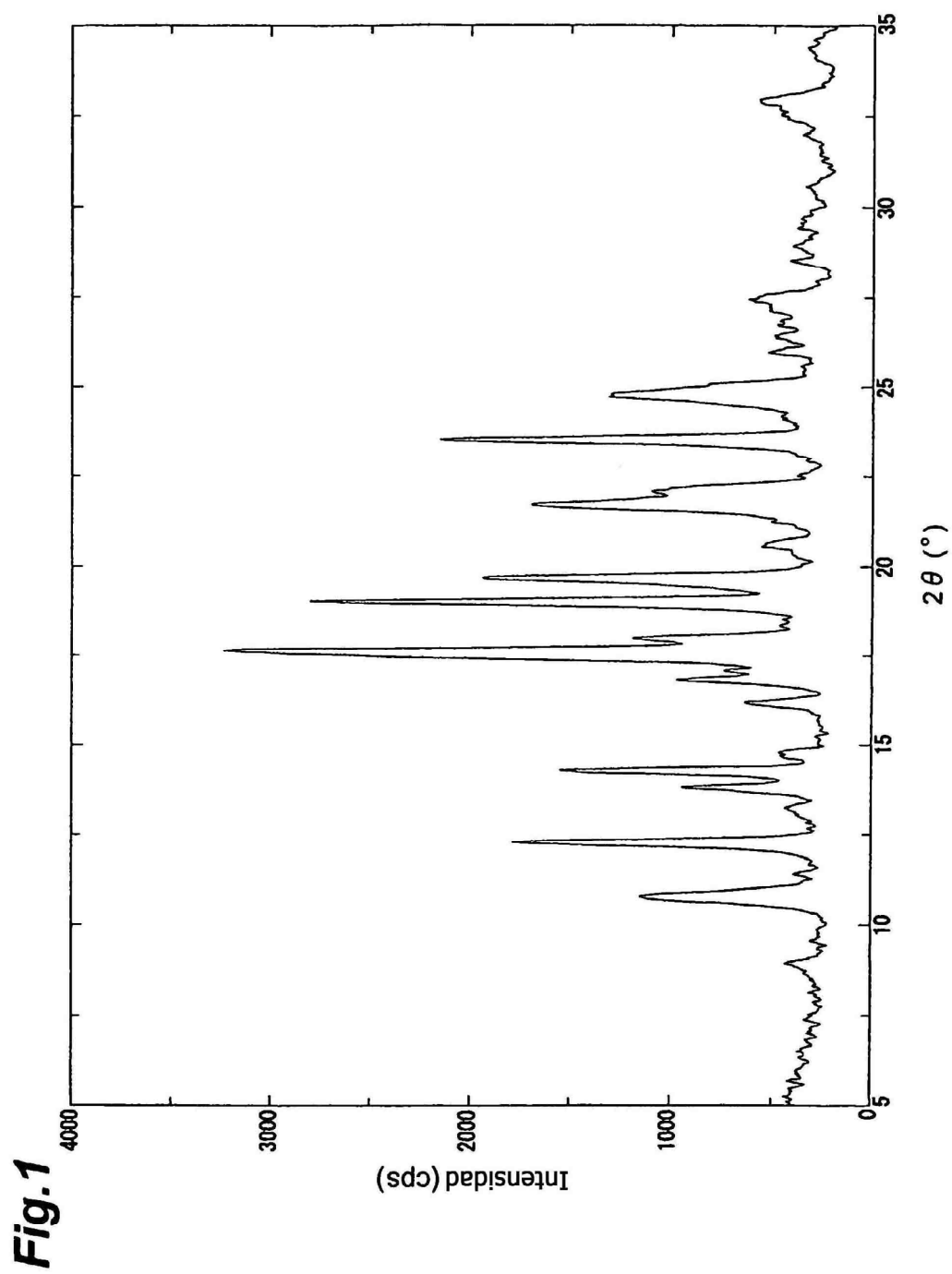
ttaattctgc agctatgatg tctccagaa gga 33

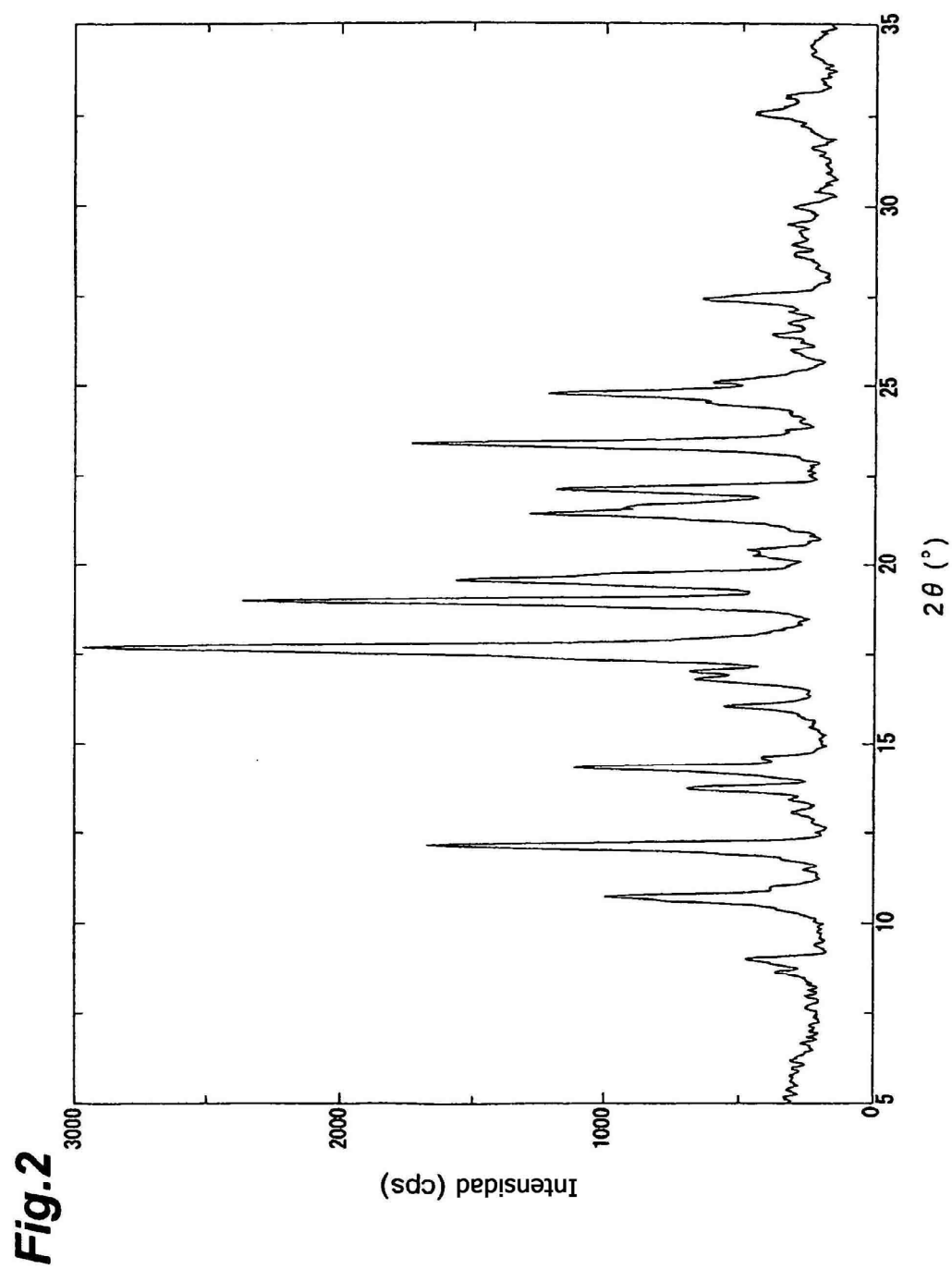
REIVINDICACIONES

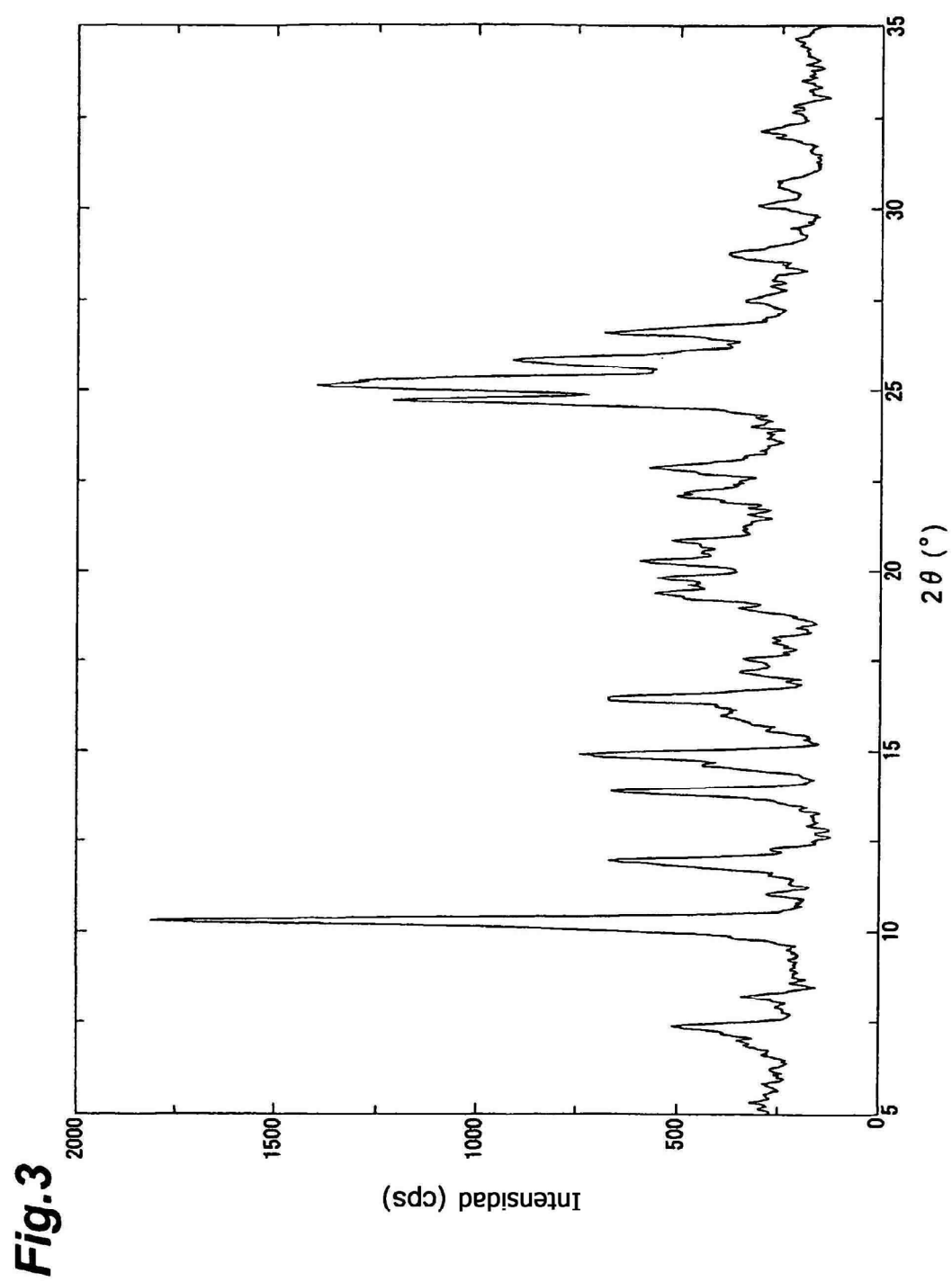
- 1.- Una sal de adición de ácidos de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico y ácido tartárico.
- 2.- Cristales de malato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 1.
- 3.- Cristales de acuerdo con la reivindicación 2, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $17,7^\circ$, $19,0^\circ$ y $23,5^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.
- 4.- Cristales de tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 1.
- 5.- Cristales de acuerdo con la reivindicación 4, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $12,2^\circ$, $17,7^\circ$ y $23,4^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.
- 6.- Cristales de acuerdo con la reivindicación 4, que tienen picos a desplazamientos químicos ($\pm 0,5$ ppm) de 175,7 ppm, 166,7 ppm, 154,9 ppm y 45,7 ppm en un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C sólido.
- 7.- Una sal de adición de ácidos de *N*-{2,5-difluoro-4-[[2-([3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido 4-metilbencenosulfónico.
- 8.- Cristales de una sal de adición de ácidos de *N*-{2,5-difluoro-4-[[2-([3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, seleccionándose el ácido entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido etanosulfónico y ácido bencenosulfónico, de acuerdo con la reivindicación 7.
- 9.- Cristales de metanosulfonato de *N*-{2,5-difluoro-4-[[2-([3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 7.
- 10.- Cristales de acuerdo con la reivindicación 9, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $17,7^\circ$, $20,4^\circ$ y $21,7^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.
- 11.- Cristales de 4-metilbencenosulfonato de *N*-{2,5-difluoro-4-[[2-([3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 1.
- 12.- Cristales de acuerdo con la reivindicación 11, que tienen picos de difracción a ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $7,2^\circ$, $17,3^\circ$ y $23,6^\circ$ en una difracción de rayos X en polvo.
- 13.- Un procedimiento para preparar cristales de malato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por mezclar *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes, y ácido málico para formar una solución, y depositar después los cristales.
- 14.- Un procedimiento para preparar cristales de tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por mezclar *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes, y ácido tartárico para formar una solución, y depositar después los cristales.
- 15.- Un procedimiento para preparar cristales de tartrato de *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por mezclar *N*-(2-fluoro-4-[[2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, agua y ácido tartárico para formar una solución, y añadir después un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes y depositar los cristales.
- 16.- Un procedimiento para preparar cristales de una sal de adición de ácidos de *N*-{2,5-difluoro-4-[[2-([3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida; de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por mezclar *N*-{2,5-difluoro-4-[[2-([3-hidroxiazetidín-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi]fenil}-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropan-1,1-dicarboxiamida, un disolvente seleccionado entre cetonas y alcoholes y

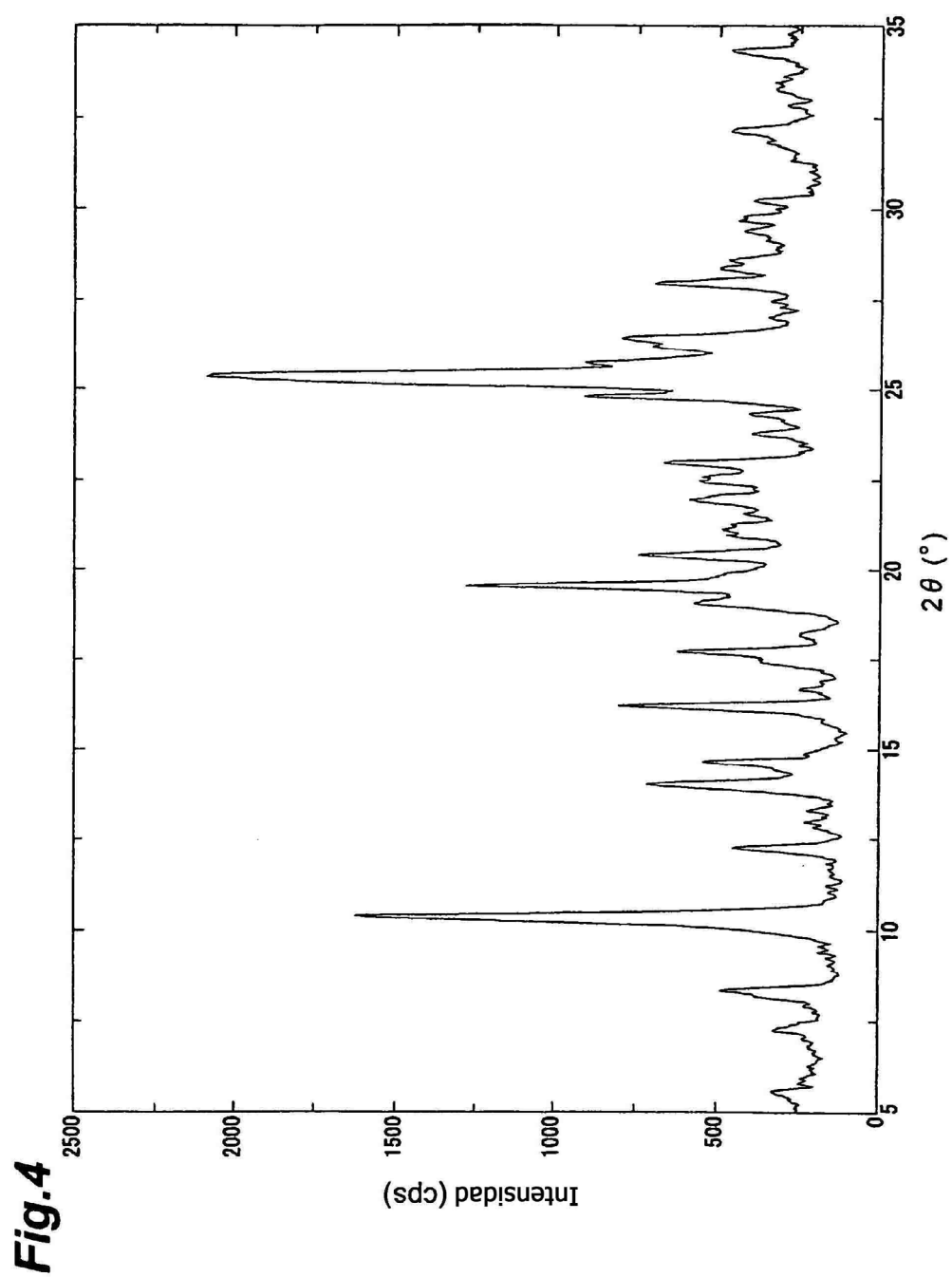
un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido 4-metilbencenosulfónico para formar una solución, y depositar después los cristales.

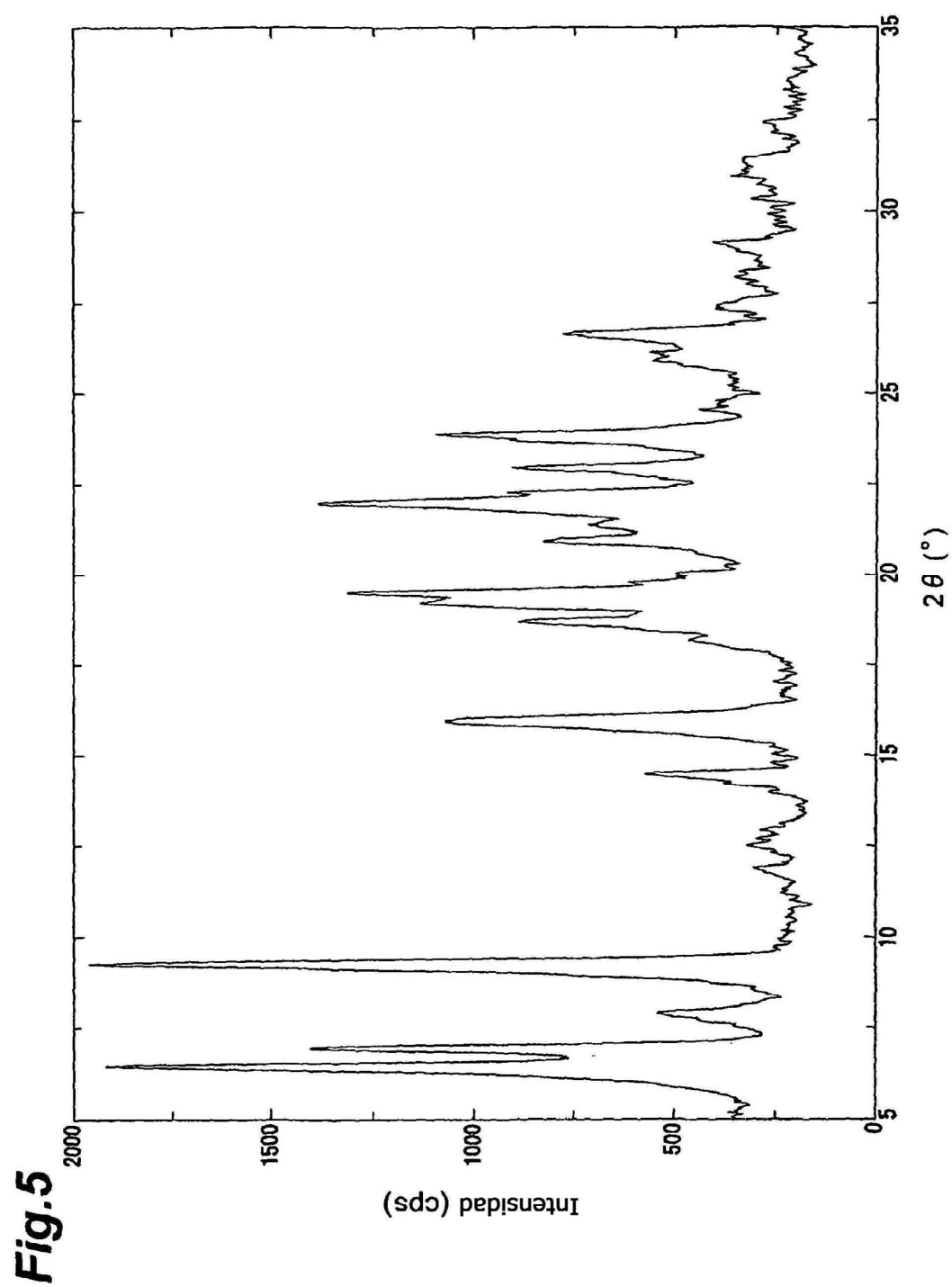
- 5 17.- Una composición farmacéutica que comprende cristales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 18.- Un agente anti-tumoral que comprende cristales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 19.- Un inhibidor para metástasis del cáncer que comprende cristales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 10 20.- Una composición farmacéutica que comprende cristales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.
- 21.- Un agente anti-tumoral que comprende cristales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.
- 22.- Un inhibidor para metástasis del cáncer que comprende cristales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

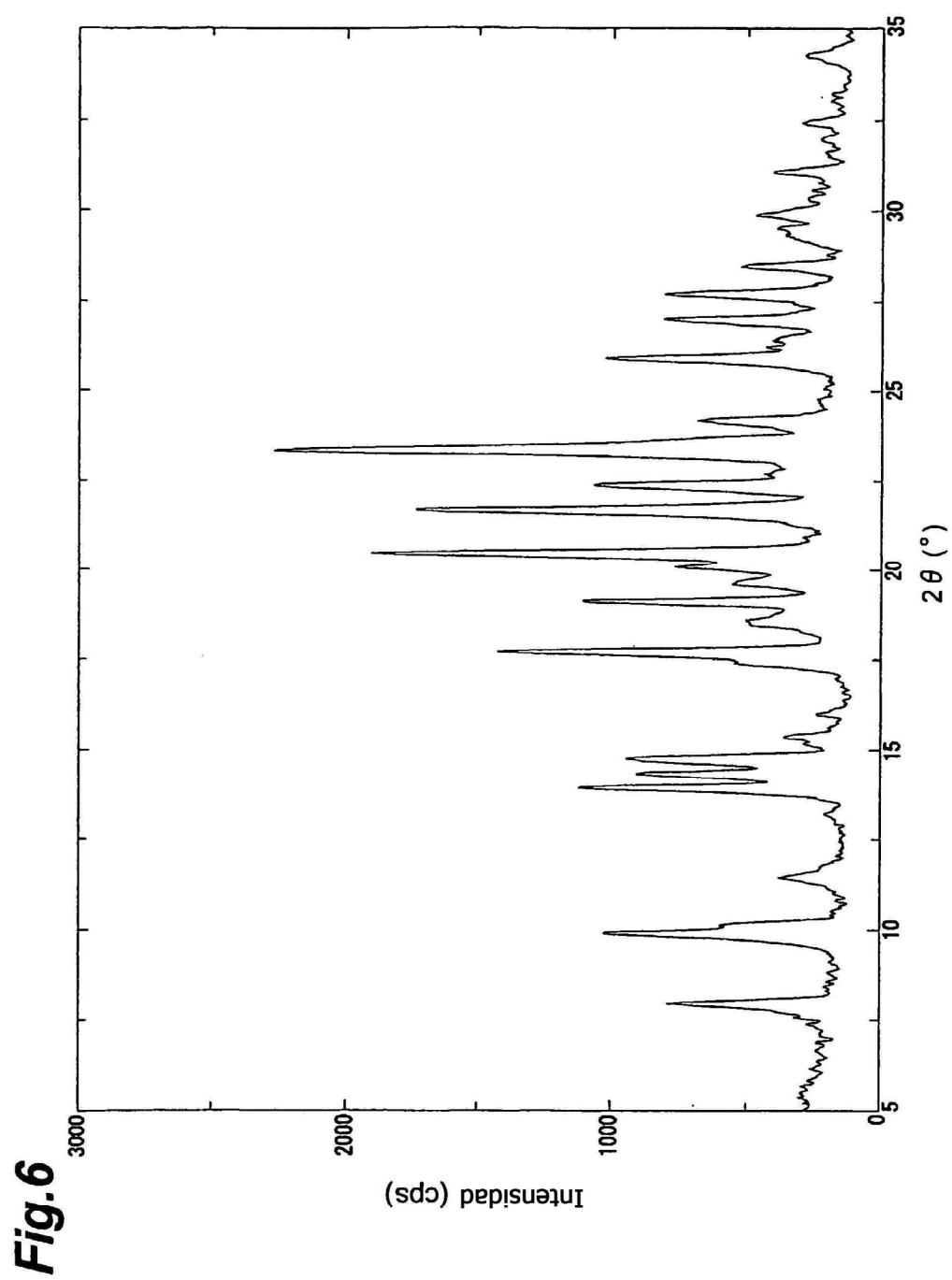


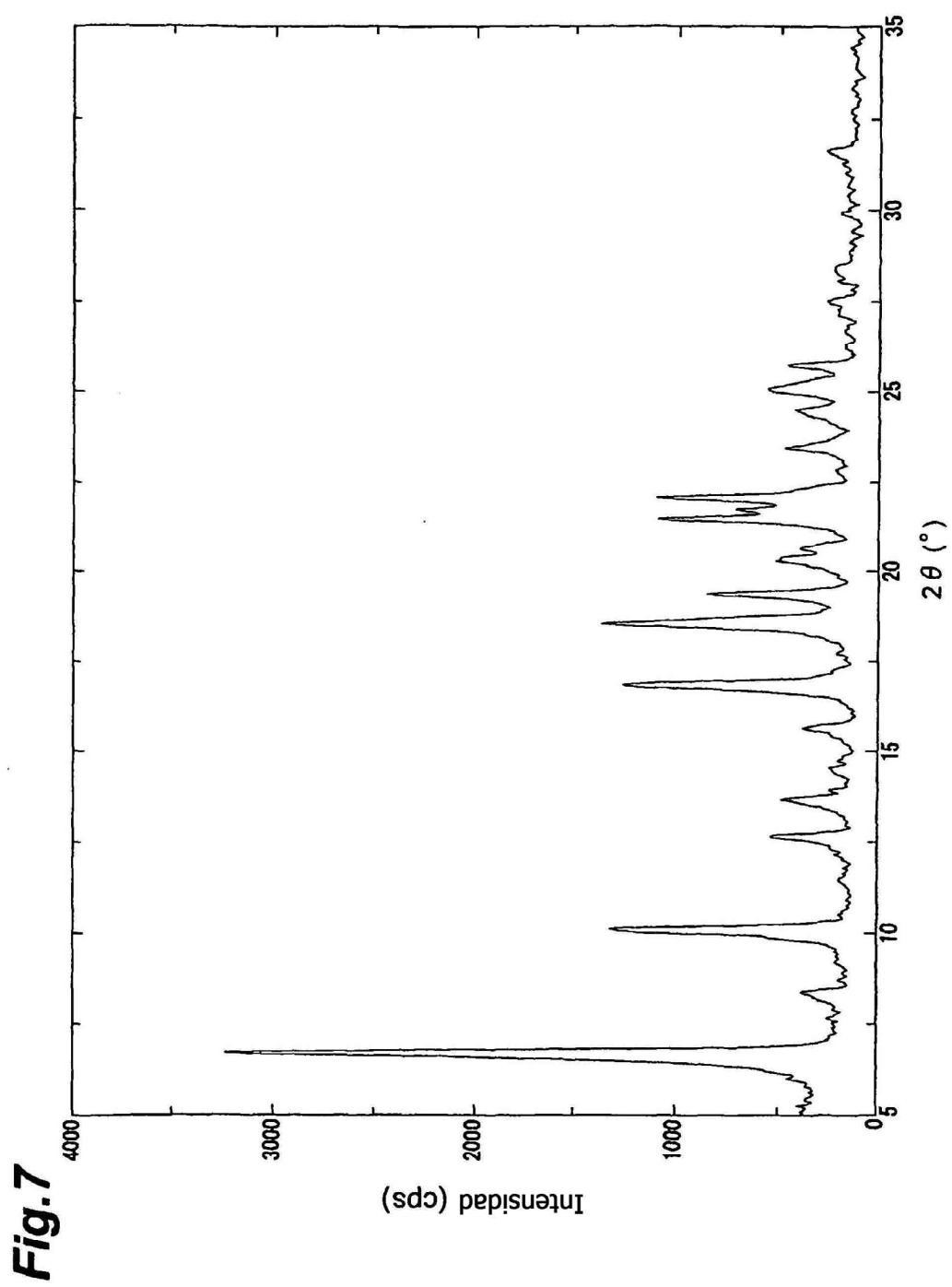


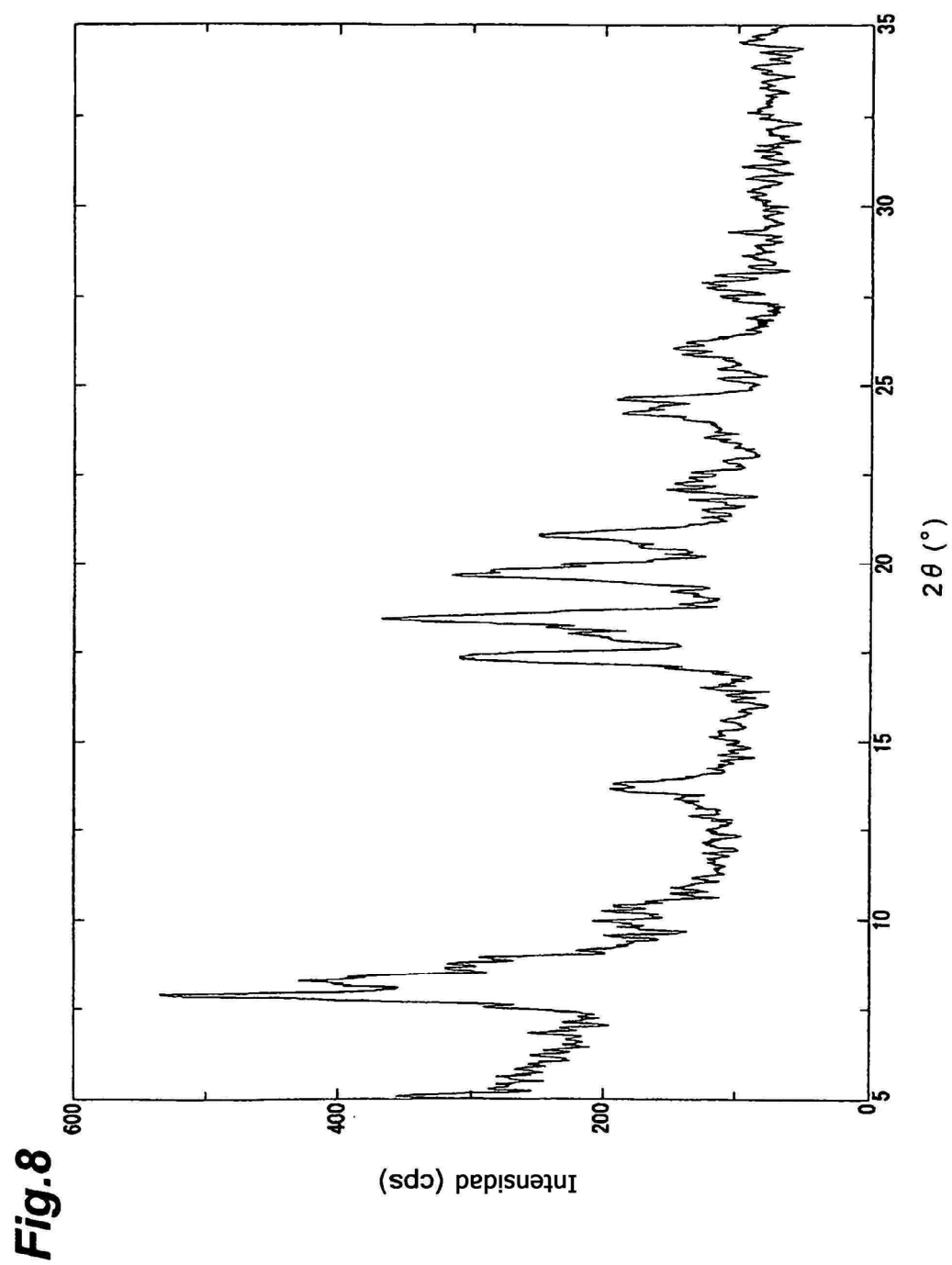


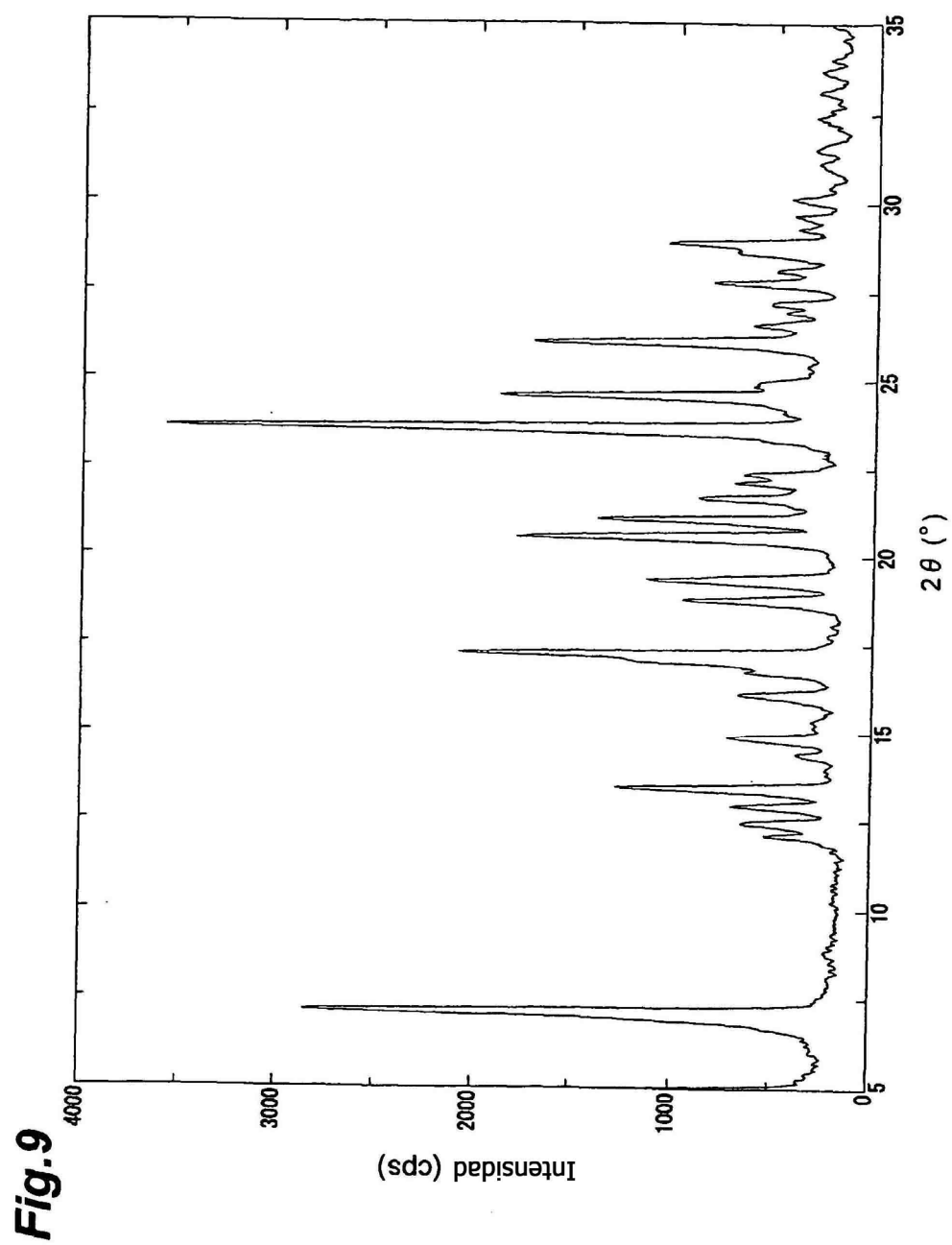


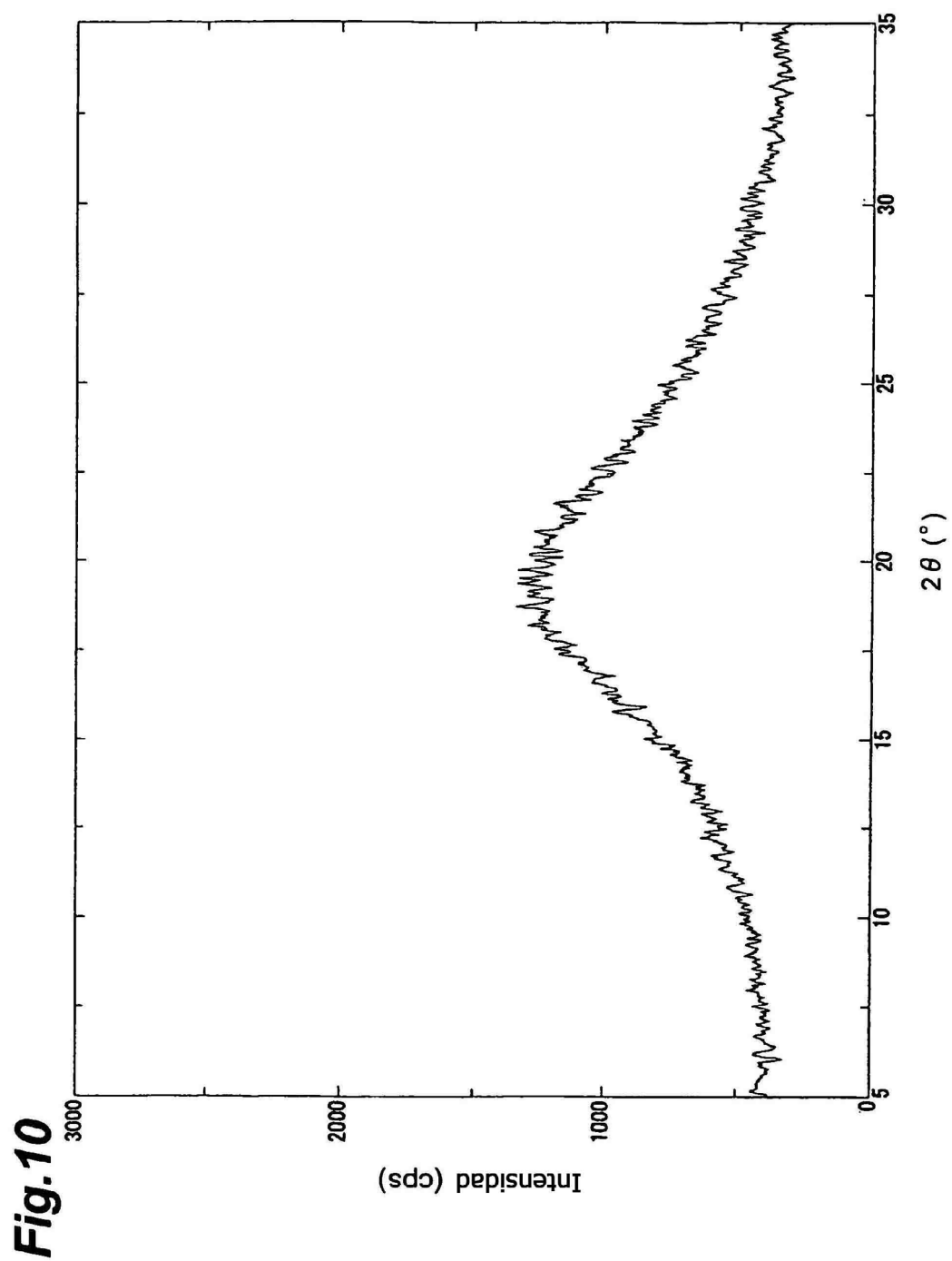


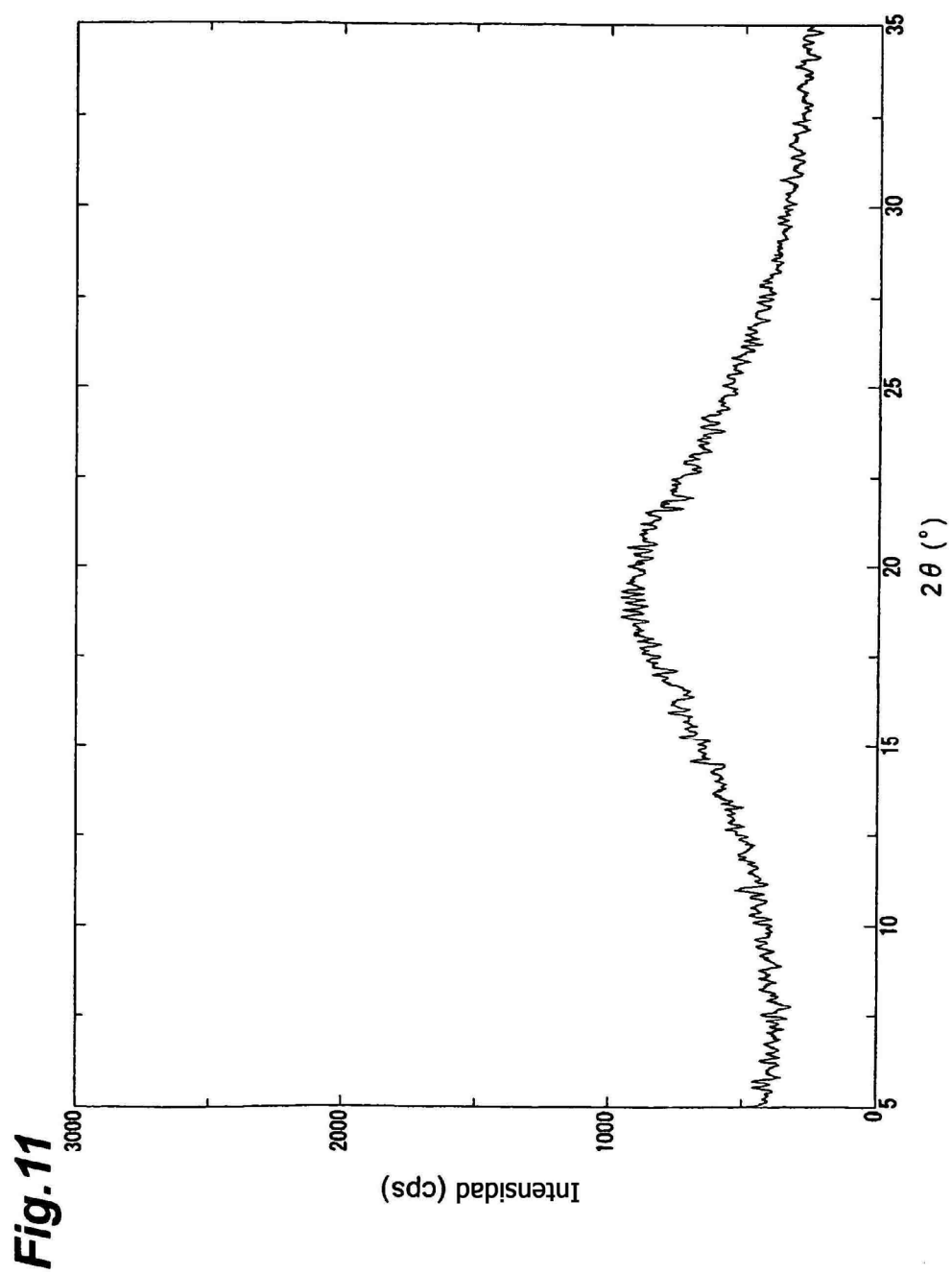


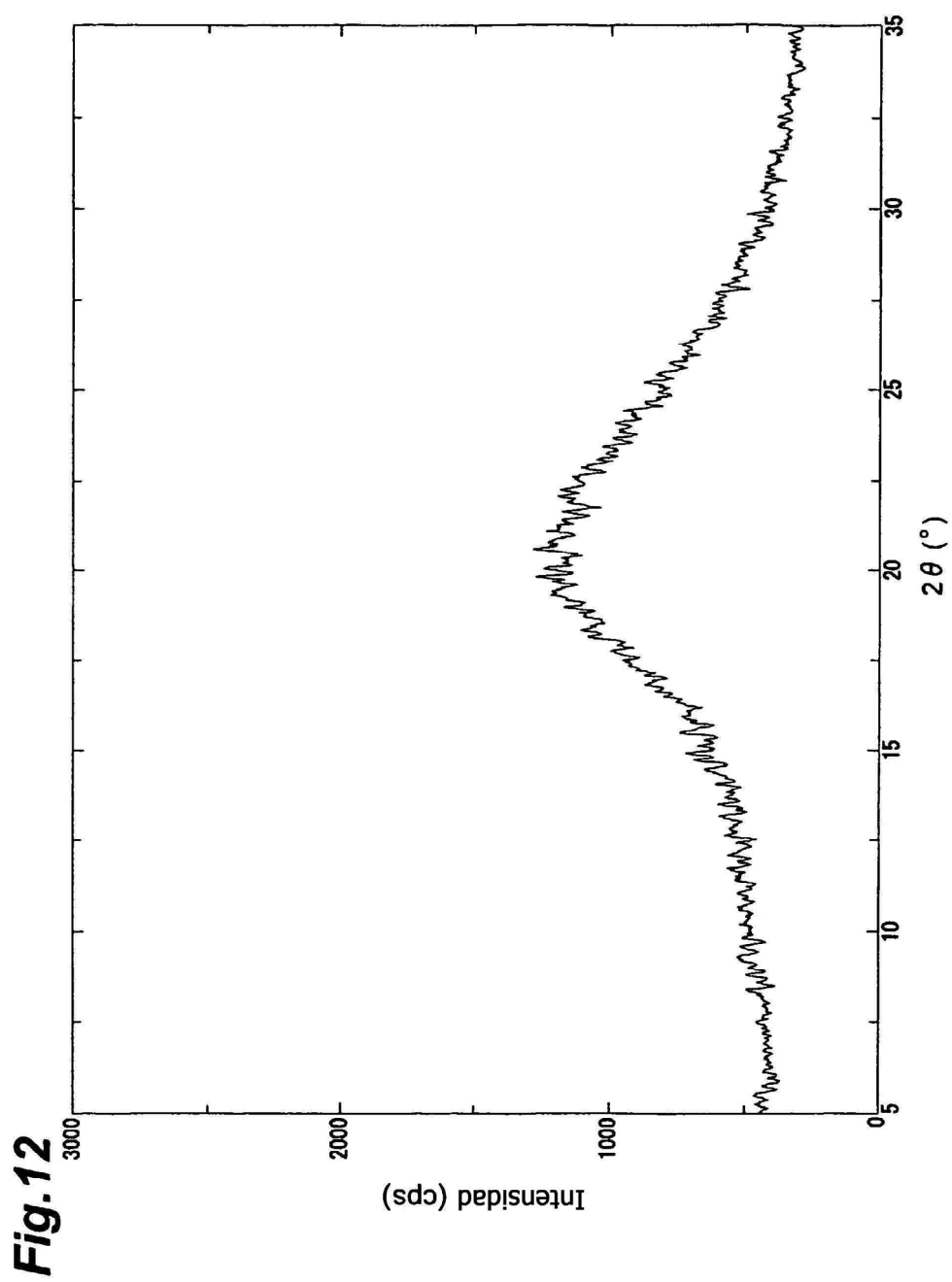












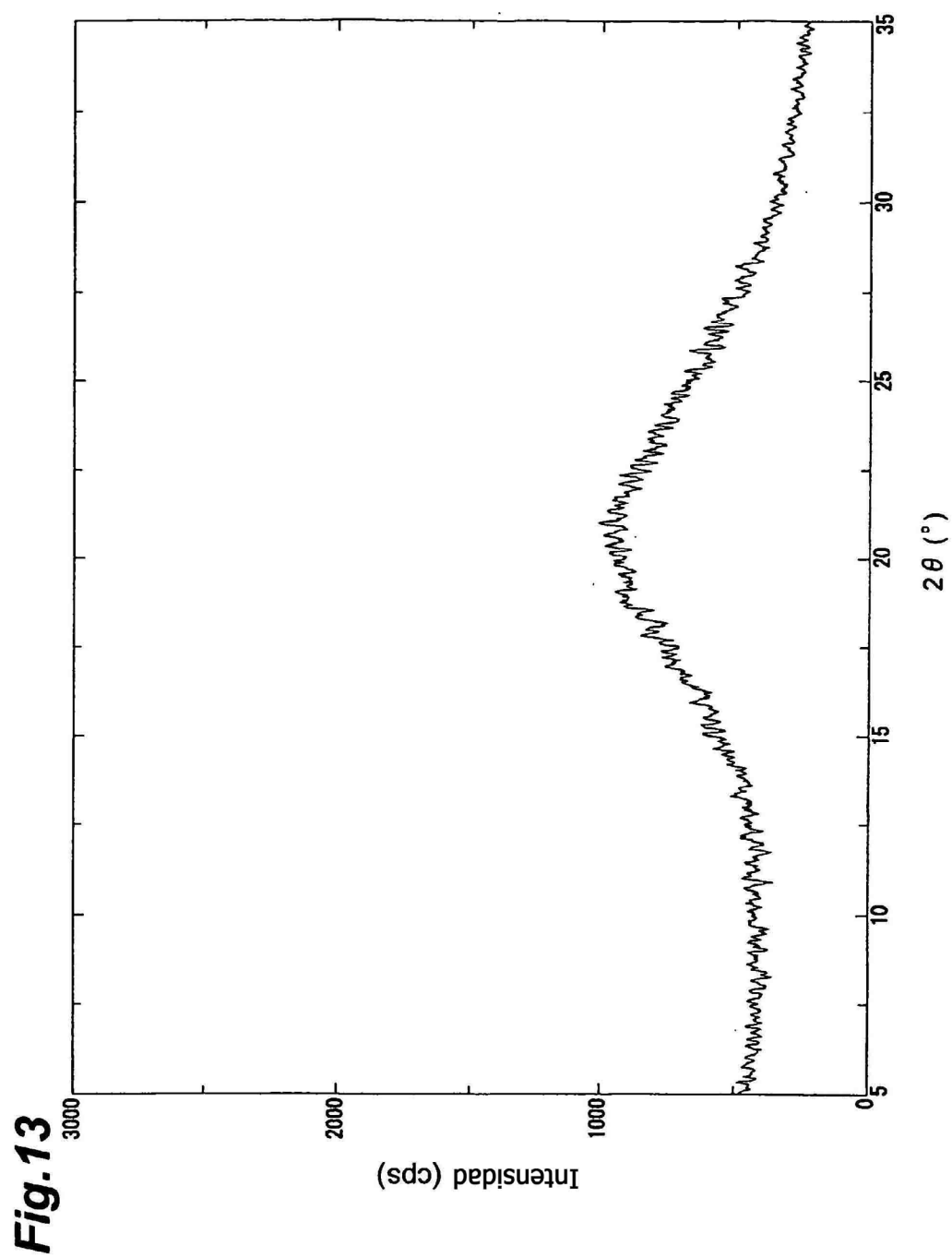


Fig.14

