

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 013**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2016 PCT/JP2016/068381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16208576**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2016 E 16814346 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3315499**

54 Título: **Cristal de (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidín-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida**

30 Prioridad:

23.06.2015 US 201562183577 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2021

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
4-6-10, Koishikawa Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**KUSHIDA IKUO y
ITO YOKO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 870 013 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cristal de (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidín-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un cristal de compuesto (6S,9aS)-N-bencil-6-[(4-hidroxifenil)metil]-4,7-dioxo-8-({6-[3-(piperazin-1-il)azetidín-1-il]piridin-2-il}metil)-2-(prop-2-en-1-il)-octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1-carboxamida.

Antecedentes de la técnica

- 10 Una ruta de señalización Wnt se conserva independientemente de la diferencia en las especies de organismos, y es conocida como una ruta importante implicada en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de los organismos vivos. En años recientes, sin embargo, se ha dado a conocer que la activación constitutiva de la ruta está implicada en el desarrollo de la transformación maligna de la fibrosis y el cáncer. Se sabe que, particularmente en cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de endometrio, cáncer de hígado y cáncer de próstata, la ruta de señalización Wnt puede activarse constitutivamente por la mutación suprimible de la poliposis coli adenomatosa (APC) o la mutación activante de la β -catenina. También se sabe que, en el cáncer de páncreas, el cáncer hematológico y el cáncer de hígado, la ruta de señalización Wnt puede activarse después del tratamiento con un agente antitumoral conocido.

- 20 En las bibliografías 1 y 2 no de patentes, se describe que se puede lograr una excelente actividad antitumoral inhibiendo la ruta de señalización Wnt. En las bibliografías 12, 13 y 14 no de patentes, se describe que se puede lograr un efecto excelente sobre la fibrosis inhibiendo la ruta de señalización Wnt. De este modo, la ruta de señalización Wnt ha atraído la atención como una nueva diana para el tratamiento de tumores o el tratamiento de la fibrosis.

En las bibliografías 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 no de patentes, se describen compuestos o anticuerpos capaces de inhibir las rutas de señalización Wnt, y se da a conocer que los compuestos o los anticuerpos pueden actuar sobre la tankyrasa, cinasa que interactúa con Traf2 y Nck (TNK), porcupina, receptor Frizzled.

- 25 Además, los compuestos que tienen cada uno una cadena principal de octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazina se conocen como moduladores de la ruta de señalización Wnt, y se muestra la relación entre los compuestos y enfermedades tales como el cáncer y la fibrosis (Bibliografías 1 a 3 de patentes).

El documento WO 2015/098853 describe el presente compuesto en forma sólida.

El documento WO 2009051397 describe inhibidores de wnt que difieren en estructura y en forma cristalina del presente compuesto.

- 30 Lista de citas

Bibliografía de patentes

[Bibliografía 1 de patentes] WO 2009/051397 A

[Bibliografía 2 de patentes] US 2010/0286094 A

[Bibliografía 3 de patentes] WO 2009/148192 A

- 35 Bibliografía no de patentes

[Bibliografía 1 no de patente] Nick Barker et al., "Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics", Nature reviews Drug discovery 2006 Dec; 5(12):997-1014.

[Bibliografía 2 no de patente] Katayoon H. Emami et al., "A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2004, 101(34), p.12682-12687.

- 40 [Bibliografía 3 no de patente] Baozhi Chen et al., "Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer", Nat Chem Biol., 2009, 5(2), p.100-107.

[Bibliografía 4 no de patente] Shih-Min A. Huang et al., "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling", Nature, 2009, 461, p.614-620.

- 45 [Bibliografía 5 no de patente] Lari Lehtio et al., "Tankyrases as drug targets", The FEBS Journal, 2013, 280, 3576-3593.

[Bibliografía 6 no de patente] Miki Shitashige et al., "Traf2- and Nck-Interacting Kinase Is Essential for Wnt Signaling and Colorectal Cancer Growth", Cancer Res., 2010, 70(12), 5024-5033.

[Bibliografía 7 no de patente] Austin Gurney et al., "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2012, 109(29), 11717-11722.

5 [Bibliografía 8 no de patente] Xiaomo Jiang et al., "Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2013, 110(31), 12649-12654.

[Bibliografía 9 no de patente] Jo Waaler et al., "Novel Synthetic Antagonists of Canonical Wnt Signaling Inhibit Colorectal Cancer Cell Growth", Cancer Res, 2011, 71(1), 197-205.

[Bibliografía 10 no de patente] H Yao et al., "AV-65, a novel Wnt/ β -catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model", Blood Cancer Journal, 2011, 1, e43.

10 [Bibliografía 11 no de patente] De Robertis A et al., "Identification and characterization of a small-molecule inhibitor of Wnt signaling in glioblastoma cells", Mol Cancer Ther., 2013, 12(7), 1180-1189.

[Bibliografía 12 no de patente] Anna P. Lam et al., " β -catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target", Curr Opin Rheumatol. 2011 November; 23(6): 562-567.

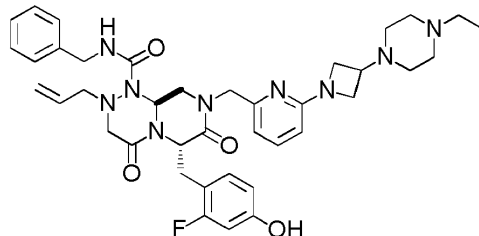
15 [Bibliografía 13 no de patente] Sha Hao et al., "Targeted Inhibition of β -Catenin/CBP Signaling Ameliorates Renal Interstitial Fibrosis", J. Am. Soc. Nephrol. 22: 1642-1653, 2011.

[Bibliografía 14 no de patente] William R. Henderson, Jr. et al., "Inhibition of Wnt/ β -catenin/CREB binding protein(CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2010, 107(32), 14309-14314.

Resumen de la invención

Problema técnico

20 (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida (en lo sucesivo denominada "Compuesto 1"), que es un compuesto representado por la siguiente fórmula, tiene una actividad moduladora de la ruta Wnt.



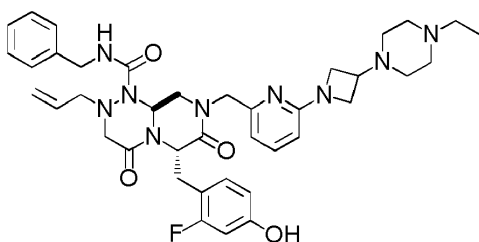
25 Generalmente, las propiedades físicas de los compuestos y sus sales y cristales de los mismos usados como productos farmacéuticos tienen un gran efecto sobre la biodisponibilidad de los fármacos, la pureza de las sustancias farmacéuticas, y la formulación farmacéutica. Por tanto, el problema a resolver por la presente invención es proporcionar un cristal del Compuesto 1 que tenga un uso potencial como sustancia farmacéutica para productos farmacéuticos.

Solución al problema

30 Los presentes inventores han completado la presente invención como resultado de esfuerzos diligentes.

Es decir, la presente invención proporciona los siguientes [1] a [11]:

[1] Un cristal de (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida.



35 en el que el cristal tiene un pico de difracción en el ángulo de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.

[2] El cristal según [1], en el que el cristal tiene picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$, $6,4^\circ$ y $10,1^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.

[3] El cristal según [2], en el que el cristal tiene además picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $8,0^\circ$ y $12,8^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.

5 [4] El cristal según [3], en el que el cristal tiene además picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $14,2^\circ$, $16,0^\circ$, $18,9^\circ$, $19,7^\circ$ y $23,1^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.

[5] El cristal según [1]-[4], en el que el cristal tiene un pico en el desplazamiento químico ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $154,7$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.

10 [6] El cristal según [1]-[5], en el que el cristal tiene además picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $141,1$ ppm y $158,1$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.

[7] El cristal según [1]-[6], en el que el cristal tiene además picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $134,0$ ppm y $165,1$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.

[8] El cristal según [1]-[7], en el que el cristal tiene además picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $12,6$ ppm, $55,5$ ppm y $118,5$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.

15 [9] El cristal según [1]-[8], en el que el cristal tiene sustancialmente el mismo patrón de difracción de rayos X de polvo que el patrón de difracción de rayos X de polvo mostrado en la FIG. 4.

[10] El cristal de [1]-[9], en el que el cristal tiene sustancialmente el mismo espectro de RMN ^{13}C en estado sólido que el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido mostrado en la FIG. 6.

[11] Una composición farmacéutica que comprende un cristal según uno cualquiera de [1] a [10].

20 Efectos ventajosos de la invención

El cristal del Compuesto 1 según la presente invención tiene las propiedades ilustradas en los Ejemplos, y tiene un uso potencial como sustancia farmacéutica para productos farmacéuticos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados del Ejemplo 2 de Ensayo. La ordenada indica el número de pólipos por ratón.

25 La FIG. 2 muestra los resultados del Ejemplo 3 de Ensayo. La abscisa indica el número de días transcurridos, y la ordenada indica el volumen tumoral relativo (RTV) con respecto al volumen tumoral en el día 0.

La FIG. 3 muestra los resultados del Ejemplo 3 de Ensayo. La abscisa indica el número de días transcurridos, y la ordenada indica el peso corporal relativo (RBW) con respecto al peso corporal en el día 0.

30 La FIG. 4 es un patrón de difracción de rayos X de polvo del cristal del Compuesto 1 en el Ejemplo 4 de Ensayo. La abscisa indica el ángulo de difracción (2θ), y la ordenada indica la intensidad del pico.

La FIG. 5 muestra los resultados del Ejemplo 5 de Ensayo. La abscisa indica la temperatura, la ordenada izquierda indica el cambio de peso en termogravimetría (TG), y la ordenada derecha indica el flujo de calor en análisis térmico diferencial (DTA).

35 La FIG. 6 es el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido del cristal del Compuesto 1 en el Ejemplo 6 de Ensayo. La abscisa indica el desplazamiento químico (δ), y la ordenada indica la intensidad del pico.

Descripción de realizaciones

En la presente memoria descriptiva, los ejemplos de cristales preferidos incluyen:

el cristal del Compuesto 1 que tiene un pico de difracción en el ángulo de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$ en difracción de rayos X de polvo;

40 el cristal del Compuesto 1 que tiene picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$, $6,4^\circ$ y $10,1^\circ$ en difracción de rayos X de polvo;

el cristal del Compuesto 1 que tiene picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$, $6,4^\circ$, $8,0^\circ$, $10,1^\circ$ y $12,8^\circ$ en difracción de rayos X de polvo; y

45 el cristal del Compuesto 1 que tiene picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$, $6,4^\circ$, $8,0^\circ$, $10,1^\circ$, $12,8^\circ$, $14,2^\circ$, $16,0^\circ$, $18,9^\circ$, $19,7^\circ$ y $23,1^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.

Cada uno de los picos de difracción mencionados anteriormente en la difracción de rayos X de polvo es específico y característico de los cristales del Compuesto 1.

Generalmente, como el ángulo de difracción (2θ) en la difracción de rayos X de polvo puede tener un error dentro de $\pm 0,2^\circ$, debe entenderse que los valores de ángulos de difracción mencionados anteriormente también incluyen valores dentro de alrededor de $\pm 0,2^\circ$. Por lo tanto, no sólo se incluyen en la presente invención cristales que tienen ángulos de difracción de picos completamente consistentes en difracción de rayos X de polvo, sino también cristales que tienen ángulos de difracción de picos consistentes dentro de un error de alrededor de $\pm 0,2^\circ$.

En la presente memoria descriptiva, por ejemplo, “tener un pico de difracción en el ángulo de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$ ” significa “tener un pico de difracción en el ángulo de difracción (2θ) de $5,6^\circ$ a $6,0^\circ$ ”, y lo mismo se aplica a otros ángulos de difracción.

Generalmente, incluso si las formas cristalinas son idénticas entre sí, la intensidad o semianchura de los picos en el ángulo de difracción (2θ) en la difracción de rayos X de polvo varía de una medida a otra, debido a la diferencia en las condiciones de medida y a la variación en el tamaño o la forma de las partículas de los cristales de polvo usados como muestras de medida, y no se muestran necesariamente las intensidades o anchuras constantes de los picos. Por esta razón, en comparación con los patrones de difracción de rayos X de polvo, si los ángulos de difracción (2θ) son idénticos entre sí pero las intensidades de los picos o sus semianchuras son diferentes, la diferencia no significa que las formas cristalinas de los cristales medidos son diferentes entre sí. Por lo tanto, se quiere decir que el cristal del compuesto que muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene tal diferencia con respecto al pico de difracción característico del cristal específico de la presente invención tiene la misma forma de cristal que el cristal del compuesto de la presente invención. En la presente memoria descriptiva, “tener sustancialmente el mismo patrón de difracción de rayos X de polvo que el patrón de difracción de rayos X de polvo mostrado en la FIG. 4” significa que el patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene un pico de difracción característico es el mismo que el patrón de difracción de rayos X de polvo mostrado en la FIG. 4, no solo cuando es completamente consistente con el patrón de difracción de rayos X de polvo mostrado en la FIG. 4, sino también cuando su intensidad del pico o semianchura es diferente o es consistente dentro de un intervalo de error de alrededor de $\pm 0,2^\circ$ con el patrón de difracción de rayos X de polvo mostrado en la FIG. 4. Por lo tanto, se quiere decir que todos los cristales que tienen tales patrones de difracción de rayos X de polvo son los mismos cristales que el cristal de la presente invención.

En la presente memoria descriptiva, los ejemplos de cristales preferidos incluyen:

el cristal del Compuesto 1 que tiene un pico en el desplazamiento químico ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 154,7 ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido;

el cristal del Compuesto 1 que tiene picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 141,1 ppm, 154,7 ppm y 158,1 ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido;

el cristal del Compuesto 1 que tiene picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 134,0 ppm, 141,1 ppm, 154,7 ppm, 158,1 ppm y 165,1 ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido; y

el cristal del Compuesto 1 que tiene picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 12,6 ppm, 55,5 ppm, 118,5 ppm, 134,0 ppm, 141,1 ppm, 154,7 ppm, 158,1 ppm y 165,1 ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.

Cada uno de los picos mencionados anteriormente en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido es específico y característico del cristal del Compuesto 1.

En la presente memoria descriptiva, “tener los picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 12,6 ppm, 55,5 ppm, 118,5 ppm, 134,0 ppm, 141,1 ppm, 154,7 ppm, 158,1 ppm y 165,1 ppm” significa “tener los picos sustancialmente equivalentes a los picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 12,6 ppm, 55,5 ppm, 118,5 ppm, 134,0 ppm, 141,1 ppm, 154,7 ppm, 158,1 ppm y 165,1 ppm, respectivamente, cuando se lleva a cabo la espectroscopia de RMN ^{13}C en estado sólido en condiciones normales o sustancialmente en las mismas condiciones que las descritas en la presente memoria descriptiva.

Para determinar si se tienen o no “los picos sustancialmente equivalentes”, generalmente, puesto que el desplazamiento químico (δ) en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido puede tener un error dentro de $\pm 0,5$ ppm, debe entenderse que los valores antes mencionados de los desplazamientos químicos también incluyen valores dentro de alrededor de $\pm 0,5$ ppm. Por lo tanto, no solo los cristales que tienen los cambios químicos completamente consistentes en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido, sino también los cristales que tienen los desplazamientos químicos consistentes dentro de un error de alrededor de $\pm 0,5$ ppm se incluyen en la presente invención. Por esta razón, en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, “tener un pico en el desplazamiento químico ($\delta \pm 0,5$ ppm) de 12,6 ppm” significa “tener un pico en el desplazamiento químico (δ) de 12,1 ppm a 13,1 ppm”, y lo mismo se aplica a otros desplazamientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido. Además, “cristal que tiene sustancialmente el mismo espectro de RMN ^{13}C en estado sólido como se muestra en la FIG. 6” significa que, no solo cuando el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido que tiene un pico en un cierto desplazamiento químico es

completamente consistente con el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido mostrado en la FIG. 6, sino también cuando su intensidad del pico es diferente o su pico característico es consistente dentro de un intervalo de error de alrededor de $\pm 0,5$ ppm, el cristal es un cristal que tiene el mismo espectro de RMN ^{13}C en estado sólido como se muestra en la FIG. 6. Por lo tanto, se quiere decir que todos los cristales que tengan un espectro de RMN ^{13}C en estado sólido son los mismos cristales que el cristal de la presente invención.

A continuación, se describirá un procedimiento para producir el cristal del Compuesto 1, que es una realización de la presente invención.

Producción del Compuesto 1

El Compuesto 1 se puede producir mediante el procedimiento descrito en los Ejemplos y Ejemplos de producción como se menciona a continuación.

Procedimiento para producir el cristal del Compuesto 1

El cristal del Compuesto 1 se puede producir mediante el procedimiento mencionado anteriormente para producir el Compuesto 1, o se puede producir calentando y disolviendo el Compuesto 1 en un disolvente, y enfriándolo con agitación para cristalizarlo.

El Compuesto 1 usado para la cristalización puede estar en cualquier forma, puede ser un solvato o hidrato o anhidrato del mismo, puede ser amorfo o cristalino (incluyendo los compuestos por una pluralidad de polimorfos), y puede ser cualquier mezcla de los mismos, pero preferiblemente es un anhidrato del mismo.

Los ejemplos del disolvente para cristalización incluyen, por ejemplo, disolventes a base de alcohol tales como metanol, etanol, 1-propanol y 2-propanol; acetonitrilo; disolventes basados en amidas tales como N,N-dimetilformamida; disolventes a base de éster tales como acetato de etilo y acetato de isopropilo; disolventes a base de hidrocarburos saturados tales como hexano y heptano; disolventes a base de cetona tales como acetona y 2-butanona; disolventes a base de éter tales como t-butil metil éter; o agua. Estos disolventes se pueden usar solos o en una mezcla de dos o más de los mismos. Cuando se lleva a cabo la cristalización en una mezcla de dos o más disolventes, es preferible usar, por ejemplo, una combinación de heptano y 1-propanol.

La cantidad del disolvente que se usará se puede seleccionar de forma adecuada, siendo el límite inferior la cantidad a la que, o por encima de la que, se disuelve el Compuesto 1 por calentamiento, o la cantidad a la que, o por encima de la que, se puede agitar su suspensión, y siendo el límite superior la cantidad a la que, o por debajo de la que, el rendimiento de cristal no disminuye significativamente.

El cristal obtenido por el procedimiento anterior tiene una forma monocristalina. Esta forma cristalina es estable, no transita fácilmente a otras formas cristalinas o forma amorfa, tiene buenas propiedades físicas, y también es adecuada para la formulación.

En la cristalización, se puede añadir o no un cristal de siembra (tal como el cristal deseado del Compuesto 1). La temperatura a la que se añaden los cristales de siembra no está particularmente limitada, pero es preferiblemente 0 a 100°C .

Para la temperatura a la que se calienta el Compuesto 1 para que se disuelva, la temperatura a la que se disuelve el Compuesto 1 puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del disolvente, pero preferiblemente está en el intervalo de 50°C a la temperatura a la que comienza el reflujo del disolvente de recristalización, y más preferiblemente 60 a 100°C .

Puesto que los cristales que contienen diferentes aspectos de los cristales (polimorfos) se dan cuando se enfrían, el enfriamiento en el momento de la cristalización se lleva a cabo deseablemente ajustando apropiadamente la velocidad de enfriamiento en consideración de la influencia sobre la calidad y el tamaño de grano del cristal, y es preferiblemente, para ejemplo, a una velocidad de enfriamiento de 5 a $40^{\circ}\text{C}/\text{hora}$. Es más preferiblemente a una velocidad de enfriamiento de 5 a $25^{\circ}\text{C}/\text{hora}$.

La temperatura de cristalización final puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del rendimiento y la calidad del cristal, y es preferiblemente de -25 a 30°C .

El cristal cristalizado se separa mediante una operación de filtración habitual, y el cristal separado mediante filtración se puede lavar con un disolvente según sea apropiado, y se puede secar adicionalmente para obtener el cristal deseado. Como disolvente usado para lavar el cristal, se puede usar el mismo disolvente que el disolvente de cristalización. Los ejemplos de tal disolvente incluyen preferiblemente, por ejemplo, etanol, acetona, 2-butanona, acetato de etilo, éter dietílico, t-butil metil éter, hexano, y heptano. Estos disolventes se pueden usar solos o en una mezcla de dos o más de los mismos.

El cristal separado por la operación de filtración se puede secar dejándolo en la atmósfera o bajo nitrógeno gaseoso, según corresponda, o calentándolo.

Para el tiempo de secado, el tiempo en el que el disolvente residual cae por debajo de una cantidad predeterminada puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la cantidad de producción, el aparato de secado y la temperatura de secado. El secado se puede realizar en condiciones de aire forzado o bajo presión reducida. El grado de presión reducida puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la cantidad de producción, el aparato de secado y la temperatura de secado. Después del secado, el cristal obtenido también se puede dejar en la atmósfera según corresponda.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar añadiendo aditivos farmacéuticamente aceptables al cristal del Compuesto 1, según sea apropiado. Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica incluyen preparaciones orales (comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, jarabes, etc.), preparaciones inyectables (para administración intravenosa, para administración intramuscular, para administración subcutánea, para administración intraperitoneal, etc.), y preparaciones para aplicaciones externas (preparaciones de absorción transdérmica (ungüentos, parches, etc.), colirios, colirios nasales, supositorios, etc.).

Estas preparaciones sólidas, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos, pueden contener el cristal del Compuesto 1 normalmente en una cantidad de 0,001 a 99,5% en masa, preferiblemente 0,001 a 90% en masa.

En el caso de preparar una preparación sólida oral, se añade un excipiente, un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un colorante, al cristal del Compuesto 1, según sea apropiado para preparar comprimidos, gránulos, polvos o cápsulas mediante un método convencional. Los comprimidos, gránulos, polvos y cápsulas también pueden recubrirse según sea apropiado.

La dosis del medicamento según la presente invención se varía generalmente dependiendo de las condiciones corporales, edades, sexos, pesos corporales, y puede ser una cantidad suficiente para desarrollar un efecto deseado. Por ejemplo, en el caso de un ser humano adulto, se administra de alrededor de 0,1 a 5000 mg (preferiblemente 0,5 a 1000 mg) por día, una vez al día o cada varios días o en 2 a 6 dosis divididas al día.

Ejemplos

El cristal del Compuesto 1 según la presente invención se puede producir mediante los métodos descritos en los Ejemplos de Producción y los Ejemplos que se mencionan a continuación. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y el cristal del compuesto según la presente invención no se limita de ninguna manera a los ejemplos específicos mencionados a continuación.

En los Ejemplos y Ejemplos de Producción, a menos que se mencione específicamente lo contrario, el gel de sílice para purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice fue YMC GEL SILICA (YMC Co., Ltd, código de catálogo: SL06I52W), el gel de sílice para purificación mediante el uso de cromatografía en columna de gel de sílice NH fue gel de sílice NH (Fuji Silysia Chemical LTD., código de catálogo: DM2035), el gel de sílice para purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice ODS fue YAMAZEN GEL ODS-SM (YAMAZEN Corporation, códigos de catálogo: W113, W116, etc.), la placa de TLC para la purificación mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice fue TLC Silica gel 60F₂₅₄ (Merck KGaA, código de catálogo: 1.05715.0001), y la placa de TLC para la purificación mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice NH fue NH SILICA GEL TLC plate (Fuji Silysia Chemical LTD., Código de catálogo: T050908).

Las abreviaturas usadas aquí son las siguientes:

NMP: N-metilpirrolidinona

THF: tetrahidrofurano

HATU: hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio

HBTU: hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio

TFA: ácido trifluoroacético

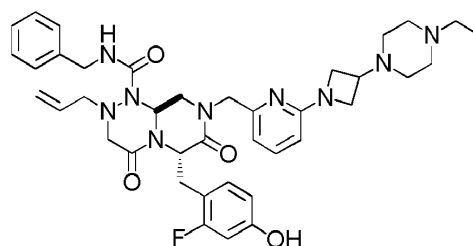
DMF: N,N-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN ¹H (resonancia magnética nuclear de protón) se registran en unidades δ (ppm) con respecto al tetrametilsilano, y las constantes de acoplamiento se registran en hercios (Hz). Las abreviaturas del patrón de división son las siguientes: s: singlete; d: doblete; t: triplete; q: cuartete; m: multiplete; y br: ancho.

[Ejemplo 1]

(6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida



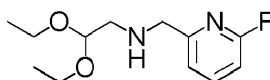
A una disolución mixta de (6S,9aS)-N-bencil-6-((2-fluoro-4-hidroxifenil)metil)-8-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)-octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1-carboxamida (397 mg, 0,689 mmoles) descrita en el Ejemplo de Producción 1-1-6 y NMP (10 ml) se añadió una mezcla (1,16 g) de 1-(azetidin-3-il)-4-etilpiperazina y bencilbenceno descrita en el Ejemplo de Producción 1-3-2 a temperatura ambiente. La mezcla resultante se irradió con un microondas a 140°C durante 12 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, después se le añadió agua, después la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica se lavó con salmuera saturada. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (metanol), y después se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (acetato de etilo:metanol = 20:1) para dar el compuesto del título (402 mg, rendimiento: 80%).

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1,00(3H, t, J = 6,8 Hz), 2,10-2,65(10H, m), 3,10-3,21(2H, m), 3,41-3,74(8H, m), 3,84-3,89(1H, m), 3,95-4,05(2H, m), 4,17-4,23(2H, m), 4,51(1H, dd, J = 6,8 Hz, 15,6 Hz), 4,95(1H, d, J = 13,6 Hz), 5,20-5,30(3H, m), 5,50-5,60(1H, m), 5,70-5,80(1H, m), 5,82-5,87(1H, m), 6,24(1H, d, J = 8,0 Hz), 6,41(1H, dd, J = 2,0 Hz, 11,2 Hz), 6,47(1H, dd, J = 8,8 Hz, 8,8 Hz), 6,69(1H, d, J = 7,2 Hz), 6,80-6,86(1H, m), 7,20-7,31(3H, m), 7,35-7,46(3H, m).

ESI-MS (m/z): 726,57 [M+H]⁺.

[Ejemplo de Producción 1-1-1]

(2,2-Diethoxietil)((6-fluoropiridin-2-il)metil)amina

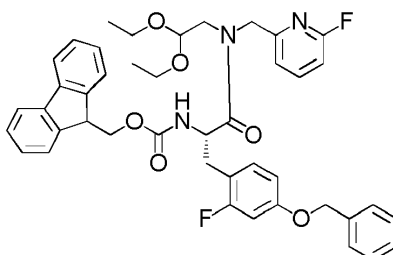


A una disolución mixta de un producto disponible comercialmente de 2,2-dietoxietan-1-amina (926 µl, 6,39 mmoles), THF (10,0 ml) y ácido acético (1,00 ml) se añadió un producto disponible comercialmente de 6-fluoropiridin-2-carbaldehído (800 mg, 6,39 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 25 minutos. Posteriormente, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (2,71 g, 12,8 mmoles) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente, y después se agitó durante 1 hora y 10 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió hidrogenocarbonato de sodio y agua para terminar la reacción. La disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (heptano:acetato de etilo = 1:1), y después se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol = 20:1) para dar el compuesto del título (1,14 g, rendimiento: 74%).

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1,22(6H, t, J = 7,2 Hz), 2,76(2H, d, J = 5,5 Hz), 3,50-3,61(2H, m), 3,65-3,76(2H, m), 3,89(2H, s), 4,64(1H, t, J = 5,5 Hz), 6,80(1H, dd, J = 2,8 Hz, 8,2 Hz), 7,22(1H, dd, J = 2,4 Hz, 7,3 Hz), 7,74(1H, q, J = 7,9 Hz).

[Ejemplo de Producción 1-1-2]

N-((1S)-2-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-1-(2,2-dietoxietil)((6-fluoropiridin-2-il)metil)carbamoil)etil)carbamoato de 9H-fluoren-9-ilmetilo

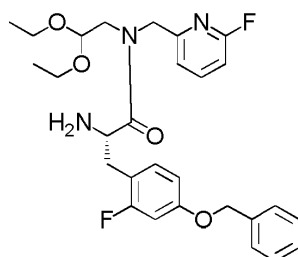


A una disolución mixta de (2,2-diethoxietil)((6-fluoropiridin-2-il)metil)amina (3,50 g, 14,4 mmoles) descrita en el Ejemplo de Producción 1-1-1 y diclorometano (25 ml) se añadieron ácido (2S)-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)propanoico (7,76 g, 15,1 mmoles) descrito en el Ejemplo de Producción 1-2-7, N-metilmorfolina (2,06 ml, 18,7 mmoles) y HATU (6,04 g, 15,8 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 13 horas. Se añadieron hidrogenocarbonato de sodio y agua a la mezcla de reacción, y la disolución resultante se extrajo con diclorometano. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida para dar un producto bruto (14,4 g) del compuesto del título. El producto se utilizó en la siguiente reacción sin más purificación.

ESI-MS (m/z): 758,50 [M+Na]⁺.

[Ejemplo de producción 1-1-3]

(2S)-2-Amino-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-N-(2,2-dietoxietil)-N-((6-fluoropiridin-2-il)metil)propanamida

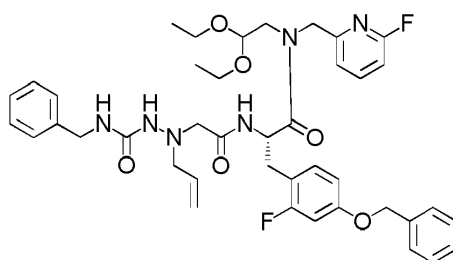


A una disolución mixta de N-((1S)-2-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-1-((2,2-dietoxietil)((6-fluoropiridin-2-il)metil)carbamoil)etil)carbamato de 9H-fluoren-9-ilmetilo descrito en el Ejemplo de Producción 1-1-2 (14,4 g) y THF (30 ml) se añadió dietilamina (5,27 ml, 50,4 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadieron metanol, agua y heptano al residuo, y la mezcla resultante se repartió. Se lavó una capa acuosa con heptano, y después se concentró a presión reducida. Se añadió agua al residuo, y la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (heptano:acetato de etilo = 1:1, y después acetato de etilo) para dar el compuesto del título (6,87 g, rendimiento: 93%).

ESI-MS (m/z): 514,32 [M+H]⁺.

[Ejemplo de producción 1-1-4]

(2S)-2-(2-(((Bencilcarbamoil)amino)(prop-2-en-1-il)amino)acetamido)-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-N-(2,2-dietoxietil)-N-((6-fluoropiridin-2-il)metil)propanamida

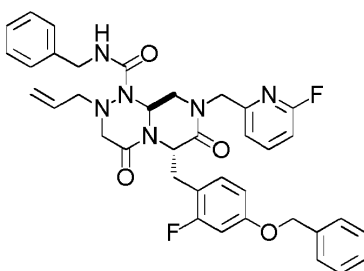


A una disolución mixta de (2S)-2-amino-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-N-(2,2-dietoxietil)-N-((6-fluoropiridin-2-il)metil)propanamida (4,87 g, 9,48 mmoles) descrita en el Ejemplo de Producción 1-1-3 y diclorometano (100 ml) se añadieron una sustancia conocida (documento WO2009/148192) ácido 2-(((bencilcarbamoil)amino)(prop-2-en-1-il)amino)acético (2,62 g, 9,95 mmoles), trietilamina (2,64 ml, 19,0 mmoles) y HBTU (3,96 g, 10,4 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (acetato de etilo, y después acetato de etilo:metanol = 30:1) para dar el compuesto del título (7,28 g, rendimiento: cuantitativo).

ESI-MS (m/z): 759,43 [M+H]⁺.

[Ejemplo de producción 1-1-5]

(6S,9aS)-N-Bencil-6-((4-(benciloxi)-2-fluorofenil)metil)-8-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)-octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1-carboxamida

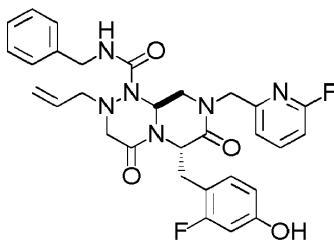


Una disolución mixta de (2S)-2-2-(((bencilcarbamoyl)amino)(prop-2-en-1-il)amino)acetamido)-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-N-(2,2-dietoxietil)-N-((6-fluoropiridin-2-il)metil)propanamida (7,28 g, 9,48 mmoles) descrita en el Ejemplo de Producción 1-1-4 y ácido fórmico (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas y 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadió una disolución acuosa de amoníaco al residuo, y la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (heptano:acetato de etilo = 1:1) para dar el compuesto del título (5,04 g, rendimiento: 80%).

ESI-MS (m/z): 667,39 [M+H]⁺.

[Ejemplo de producción 1-1-6]

(6S,9aS)-N-Bencil-6-((2-fluoro-4-hidroxifenil)metil)-8-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)-octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1-carboxamida

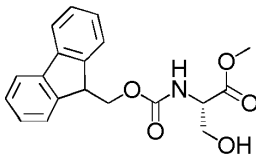


A una disolución mixta de (6S,9aS)-N-bencil-6-((4-(benciloxi)-2-fluorofenil)metil)-8-((6-fluoropiridin-2-il)metil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)-octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1-carboxamida (5,04 g, 7,56 mmoles) descrita en el Ejemplo de Producción 1-1-5 y TFA (20 ml) se añadió tioanisol (3,55 ml, 30,2 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 13 horas y 50 minutos. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadieron hidrogenocarbonato de sodio y agua al residuo, y la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (acetato de etilo:metanol = 20:1) para dar el compuesto del título (4,34 g, rendimiento: cuantitativo).

ESI-MS (m/z): 577,31 [M+H]⁺.

[Ejemplo de producción 1-2-1]

(2S)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)-3-hidroxiopropanoato de metilo

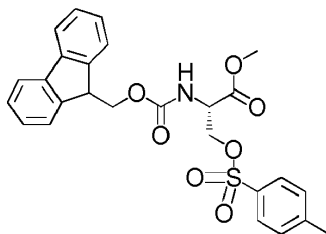


A una disolución mixta de un producto comercialmente disponible de hidrocloreto de éster metílico de L-serina (10,0 g, 64,3 mmoles), 1,4-dioxano (15 ml) y agua (90 ml) se añadió hidrogenocarbonato de sodio (10,8 g, 129 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadió una disolución de 9H-fluoren-9-ilmetilcarbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (21,7 g, 64,3 mmoles) en 1,4-dioxano (60 ml) a la disolución resultante a temperatura ambiente, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción, la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo tres veces, y la capa orgánica combinada se lavó con agua y salmuera saturada. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, se añadieron éter dietílico y heptano al residuo resultante, y se recogió un precipitado por filtración para dar el compuesto del título (22,3 g, rendimiento: cuantitativo). Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 2,00-2,15(1H, m), 3,81(3H, s), 3,89-4,07(2H, m), 4,20-

4,28(1H, m), 4,39-4,53(3H, m), 5,63-5,74(1H, m), 7,29-7,37(2H, m), 7,38-7,46(2H, m), 7,55-7,65(2H, m), 7,74-7,82(2H, m).

[Ejemplo de producción 1-2-2]

(2S)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)-3-(((4-metilbenceno)sulfonyl)-oxi)propanoato de metilo



5

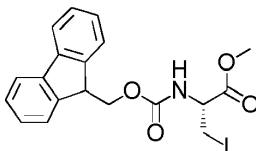
A una disolución mixta de (2S)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)-3-hidroxipropanoato de metilo (5,00 g, 14,6 mmoles) descrito en el Ejemplo de Producción 1-2-1 y piridina (25 ml) se añadieron 4-dimetilaminopiridina (18,0 mg, 0,146 mmoles) y cloruro de p-toluenosulfonilo (5,58 g, 29,3 mmoles) a 0°C, y la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 7 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción, y la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo dos veces. Una capa orgánica combinada se lavó con ácido clorhídrico 1 N tres veces, después con una disolución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, y después con salmuera saturada. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, después se añadieron acetato de etilo, éter dietílico y heptano al residuo resultante, y después se recogió un precipitado por filtración para dar el compuesto del título (6,20 g, rendimiento: 85%).

10

15 Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 2,37(3H, s), 3,74(3H, s), 4,16-4,23(1H, m), 4,23-4,31(1H, m), 4,32-4,40(2H, m), 4,41-4,48(1H, m), 4,54-4,62(1H, m), 5,63-5,66(1H, m), 7,26-7,37(4H, m), 7,38-7,45(2H, m), 7,56-7,64(2H, m), 7,72-7,81(4H, m).

[Ejemplo de producción 1-2-3]

(2R)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo



20

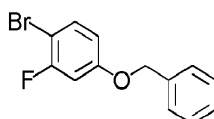
A una disolución mixta de (2S)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)-3-(((4-metilbenceno)sulfonyl)oxi)propanoato de metilo (6,20 g, 12,5 mmoles) descrito en el Ejemplo de Producción 1-2-2 y acetona (50 ml) se añadió yoduro de sodio (9,38 g, 62,6 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 90 horas y 50 minutos. La mezcla de reacción se filtró, y se concentró el filtrado a presión reducida. Se añadió agua al residuo, y la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se lavó una capa orgánica con agua, después con una disolución acuosa saturada de tiosulfato de sodio, y después con salmuera saturada. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, después se añadieron éter dietílico y heptano al residuo resultante, y se recogió un precipitado por filtración para dar el compuesto del título (3,82 g, rendimiento: 68%).

25

30 Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3,55-3,66(2H, m), 3,84(3H, s), 4,20-4,30(1H, m), 4,35-4,48(2H, m), 4,56-4,62(1H, m), 5,63-5,72(1H, m), 7,30-7,37(2H, m), 7,38-7,45(2H, m), 7,62(2H, d, J = 7,2 Hz), 7,78(2H, d, J = 7,5 Hz).

[Ejemplo de producción 1-2-4]

4-(Benciloxi)-1-bromo-2-fluorobenceno



35

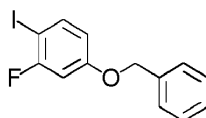
A una disolución mixta de un producto disponible comercialmente de 4-bromo-3-fluorofenol (15,0 g, 78,5 mmoles) y DMF (30 ml) se añadieron carbonato de potasio (21,7 g, 157 mmoles) y bromuro de bencilo (10,2 ml, 86,4 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, y después a 70°C durante 40 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, después se añadió agua a la mezcla de

reacción, y la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se lavó una capa orgánica con agua, y después con salmuera saturada. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano:acetato de etilo = 5:1) para dar el compuesto del título (22,7 g, rendimiento: cuantitativo).

- 5 Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,04(2H, s), 6,65-6,72(1H, m), 6,75-6,80(1H, m), 7,30-7,45(6H, m).

[Ejemplo de producción 1-2-5]

4-(Benciloxi)-2-fluoro-1-yodobenceno

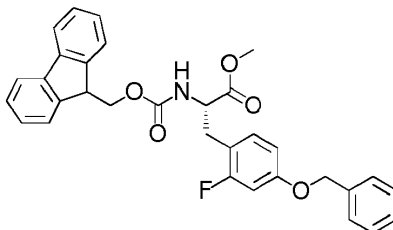


- 10 A una disolución mixta de 4-(benciloxi)-1-bromo-2-fluorobenceno (187 g, 665 mmoles) descrito en el Ejemplo de Producción 1-2-4 y 1,4-dioxano (300 ml) se añadieron yoduro de cobre (I) (12,6 g, 66,1 mmoles), yoduro de sodio (200 g, 1,33 moles) y N,N'-dimetiletilendiamina (14,0 ml, 132 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla resultante se agitó en una atmósfera de nitrógeno de 110 a 115°C durante 19 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, después se añadieron agua y acetato de etilo a la mezcla de reacción, la mezcla resultante se filtró usando Celite, y se repartió un filtrado entre la capa acuosa y la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo.
- 15 Las capas orgánicas combinadas se filtraron usando un filtro de vidrio que tenía gel de sílice colocado sobre él. El gel de sílice se lavó con acetato de etilo, las capas orgánicas obtenidas se combinaron, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano:acetato de etilo = 7:1, y después 4:1) para dar el compuesto del título (195 g, rendimiento: 89%).

- 20 Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,04(2H, s), 6,57-6,62(1H, m), 6,73(1H, dd, J = 2,8 Hz, 10,0 Hz), 7,31-7,43(5H, m), 7,55-7,60(1H, m).

[Ejemplo de producción 1-2-6]

(2S)-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-2-(((9H-fluoren-9-ilmeto)carbonil)amino)propanoato de metilo

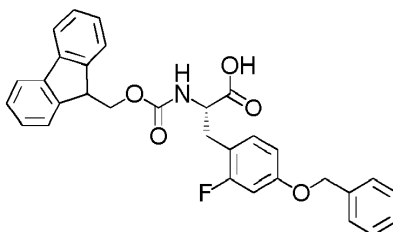


- 25 Se añadió polvo de zinc (51,6 g, 789 mmoles) a ácido clorhídrico 1 N (100 ml), la mezcla resultante se sometió a ultrasonidos y después se dejó reposar, y después se eliminó el sobrenadante de la misma. Este procedimiento se repitió dos veces. Se añadió agua (300 ml) al residuo de zinc resultante, la disolución resultante se agitó y después se dejó reposar, y después se eliminó un sobrenadante de la misma. Este procedimiento se repitió tres veces. Se añadió acetona (300 ml) al producto resultante, la mezcla se agitó y después se dejó reposar, se eliminó un sobrenadante de la misma, después se añadió éter dietílico (300 ml) a la disolución, la disolución resultante se agitó y después se dejó reposar, se eliminó un sobrenadante de la misma, y después se secó un residuo a presión reducida para dar zinc activado. Al zinc activado se añadieron DMF (120 ml) y yodo (3,36 g, 13,2 mmoles) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. A la mezcla de reacción se añadió una disolución de (2R)-2-(((9H-fluoren-9-ilmeto)carbonil)amino)-3-yodopropanoato de metilo (120 g, 266 mmoles) descrito en el Ejemplo de Producción 1-2-3 en DMF (500 ml) durante 30 minutos bajo una atmósfera
- 30 de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. A la mezcla de reacción se añadieron 4-(benciloxi)-2-fluoro-1-yodobenceno (104 g, 318 mmoles) descrito en el Ejemplo de producción 1-2-5, tris(dibencilidenacetona)paladio (0) (6,00 g, 6,55 mmoles) y 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo (5,40 g, 13,2 mmoles) bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas y 40 minutos. Se añadieron agua y acetato de etilo a la mezcla de reacción, y la disolución resultante se filtró usando Celite. Se repartió un filtrado, y se extrajo adicionalmente una capa acuosa con acetato de etilo tres veces. Una capa orgánica combinada se lavó con agua y salmuera saturada. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, después se añadieron éter dietílico (1,00 l) y heptano (1,00 l) al residuo resultante, y después se recogió un precipitado por filtración. Se añadieron éter dietílico (500 ml) y heptano (500 ml) al sólido filtrado, y se recogió un precipitado por
- 45 filtración para dar el compuesto del título (107 g, rendimiento: 77%).

Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,03-3,20(2H, m), 3,75(3H, s), 4,20(1H, t, $J = 6,6$ Hz), 4,25-4,38(1H, m), 4,43(1H, dd, $J = 7,1$ Hz, 10,4 Hz), 4,58-4,70(1H, m), 4,99(2H, s), 5,33(1H, d, $J = 8,4$ Hz), 6,63-6,72(2H, m), 6,94-7,03(1H, m), 7,26-7,48(9H, m), 7,52-7,62(2H, m), 7,77(2H, d, $J = 7,7$ Hz).

[Ejemplo de producción 1-2-7]

5 Ácido (2S)-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)propanoico



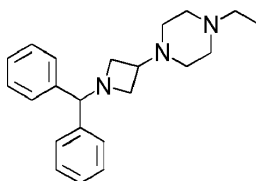
10 A una disolución mixta de (2S)-3-(4-(benciloxi)-2-fluorofenil)-2-(((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil)amino)propanoato de metilo (60,0 g, 114 mmoles) descrito en el Ejemplo de Producción 1-2-6 y acetato de etilo (1331 ml) se añadió yoduro de litio (92,0 g, 685 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a reflujo durante 23 horas y 45 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C , y se recogió un precipitado por filtración. Al sólido resultante se añadió ácido clorhídrico 1 N (228 ml). La disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se secó una capa orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida para dar el compuesto del título (42,2 g, rendimiento: 72%).

15 Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,05-3,15(1H, m), 3,18-3,30(1H, m), 4,15-4,23(1H, m), 4,25-4,50(2H, m), 4,60-4,70(1H, m), 4,99(2H, m), 5,29(1H, d, $J = 7,6$ Hz), 6,64-6,73(2H, m), 7,06(1H, dd, $J = 8,0$ Hz, 9,6 Hz), 7,24-7,44(9H, m), 7,55(2H, dd, $J = 6,4$ Hz, 6,4 Hz), 7,76(2H, d, $J = 7,6$ Hz).

ESI-MS (m/z): 512,30 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[Ejemplo de producción 1-3-1]

1-(1-(Difenilmetil)azetidín-3-il)-4-etilpiperazina

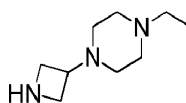


20 A una disolución mixta de un producto disponible comercialmente de 1-(difenilmetil)azetidín-3-ona (10,1 g, 42,6 mmoles), THF (100 ml) y ácido acético (5,00 ml) se añadió etilpiperazina (6,48 ml, 51,1 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (18,1 g, 85,1 mmoles) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente, y después se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadieron hidrogenocarbonato de sodio y agua a la mezcla de reacción, y después la disolución resultante se extrajo con acetato de etilo. Se lavó una capa orgánica con salmuera saturada, después se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y después se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo-metanol), y después se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH (heptano:acetato de etilo = 2:1, y después 1:1) para dar el compuesto del título (12,7 g, rendimiento: 89%).

30 Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,07(3H, t, $J = 7,6$ Hz), 2,20-2,65(10H, m), 2,85-2,93(2H, m), 2,95-3,05(1H, m), 3,35-3,45(2H, m), 4,41(1H, s), 7,15-7,20(2H, m), 7,23-7,29(4H, m), 7,37-7,42(4H, m).

[Ejemplo de producción 1-3-2]

1-(Azetidín-3-il)-4-etilpiperazina



35 A una disolución mixta de 1-(1-(difenilmetil)azetidín-3-il)-4-etilpiperazina (12,7 g, 37,9 mmoles) descrita en el Ejemplo de Producción 1-3-1 y metanol (50 ml) se añadió hidróxido de paladio-carbono (5,00 g) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente, y a 0,35 MPa a 0,40 MPa durante

10 horas. La mezcla de reacción se purgó con una atmósfera de nitrógeno, y después se filtró usando Celite. Se concentró un filtrado a presión reducida para dar el compuesto del título en forma de una mezcla (12,4 g) con bencilbenceno. El producto se utilizó en la siguiente reacción sin más purificación.

Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 1,09(3H, t, J = 7,2 Hz), 2,10-2,80(10H, m), 3,20-3,30(1H, m), 3,53-3,60(2H, m), 3,60-3,70(2H, m).

[Ejemplo 2]

Un cristal de (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida.

Se añadió acetato de isopropilo (1,5 ml) a (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida (150 mg) descrita en el Ejemplo 1, y se agitó a 85°C durante una hora, y posteriormente durante la noche a temperatura ambiente. La suspensión resultante se recogió por filtración, se lavó con acetato de isopropilo enfriado a 4°C, y después se secó a presión reducida a 45°C para obtener 141,2 mg de un sólido blanco. Se añadió 1-propanol (0,4 ml) a 100 mg del sólido obtenido, y la mezcla se calentó y disolvió a 95°C. Se añadió 1-propanol (0,1 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Se añadió heptano (1,5 ml) a la suspensión resultante a temperatura ambiente. La suspensión se recogió por filtración, se lavó con heptano enfriado a 4°C, y después se secó a presión reducida a 45°C para obtener 92,1 mg del compuesto del título.

RMN ¹H (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1,15 (t, J=7 Hz, 3 H), 2,0-3,1 (br, 8 H), 3,13 (dd, J=14, 7 Hz, 1 H), 3,32 (m, 1 H), 3,33 (m, 1 H), 3,44 (dd, J=14, 5 Hz, 1 H), 3,46 (d, J=17 Hz, 1 H), 3,54 (dd, J=12, 4 Hz, 1 H), 3,62 (dd, J=13, 6 Hz, 1 H), 3,69 (dd, J=13, 7 Hz, 1 H), 3,79 (dd, J=8, 5 Hz, 1 H), 3,86 (dd, J=8, 6 Hz, 1 H), 3,89 (t, J=11 Hz, 1 H), 4,03 (t, J=8 Hz, 1 H), 4,06 (t, J=8 Hz, 1 H), 4,25 (d, J=15 Hz, 1 H), 4,33 (d, J=16 Hz, 1 H), 4,41 (d, J=16 Hz, 1 H), 4,77 (d, J=16 Hz, 1 H), 5,12 - 5,18 (m, 2H), 5,27 (dd, J=7, 5 Hz, 1 H), 5,84 (m, 2 H), 6,30 (d, J=8 Hz, 1 H), 6,38 (m, 1 H), 6,40 (m, 1 H), 6,51 (d, J=8 Hz, 1 H), 6,88 (dd, J=9, 8 Hz, 1 H), 7,25 (dd, J=8, 7 Hz, 1 H), 7,28 (d, J=8 Hz, 2 H), 7,34 (dd, J=8, 7 Hz, 2 H), 7,47 (dd, J=8, 8 Hz, 1 H)

Ejemplo 1 ensayo: Detección de señal Wnt

pcDNA3.1(+) (Invitrogen) se escindió con las enzimas de restricción BglIII y NotI, y se le insertó un adaptador BEHKS que tiene una secuencia que se muestra a continuación (que contiene los sitios de enzimas de restricción BglIII, EcoRI, HindIII, KpnI, SacI y NotI), produciendo así un plásmido pNeo-HKS.

BEHKS-F 5'-gatctgaattcaagctctctcaggggtacctctagagagctcgc-3' (SEQ ID NO: 1)

BEHKS-R 5'-ggccgcgagctctctagaggtaccctcgagaagcttgaattca-3' (SEQ ID NO: 2)

Posteriormente, un fragmento que tiene una longitud de alrededor de 2700 pb (que contiene una secuencia que responde a Wnt y un gen de luciferasa), que se preparó escindiéndolo a partir de un plásmido TOPglow contenido en un TOPglow/FOPglow TCF Reporter Kit (nº de catálogo de Upstate: 17-366) con las enzimas de restricción HindIII y KpnI, se insertó entre HindIII y KpnI en pNeo-HKS, produciendo así un plásmido pNeo-TOP. El plásmido pNeo-TOP se introdujo en la cepa HEK293 de células renales derivadas de fetos humanos, después se seleccionó un compuesto usando G418, y después se estableció una cepa de clones de células mediante un método de dilución limitante. La cepa de clones de células se sometió a un ensayo de detección de señal Wnt.

La cepa de clones celulares se subcultivó en un medio de cultivo rico en glucosa D-MEM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía 10% de FBS y se usaron en el ensayo células en una fase de crecimiento. Las células se recolectaron usando tripsina-EDTA, se contó el número de células, y después las células se suspendieron en un medio de cultivo rico en glucosa D-MEM que contenía 10% de FBS para que el número de células fuese 2 X 10⁵ células/ml. La suspensión celular se añadió a una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Greiner Bio-One Co., Ltd., número de producto: 655083) en una cantidad de 0,1 ml/pocillo, y después se cultivó durante la noche en una incubadora con un 5% de CO₂ (37°C). Después del cultivo, una sustancia a ensayar, que se disolvió en DMSO, se diluyó con un medio de cultivo rico en glucosa D-MEM que contenía 10% de FBS y 80 mM de LiCl para producir una disolución de muestra. La disolución de muestra (0,1 ml) se añadió a cada pocillo, y después se cultivó en una incubadora con 5% de CO₂ (37°C) durante la noche. Seis horas después de la adición de la disolución de muestra, se eliminó un sobrenadante de cada pocillo, y después se le añadieron 50 µl de sustrato de luciferasa Bright-Glo™ (Promega, número de producto: E2620). La placa se colocó en un mezclador de placa durante varios segundos, y después se midió la emisión de luz de cada pocillo usando un lector de placas EnVision™ Multilabel (PerkinElmer Co., Ltd.). Se determinó el porcentaje (%) de activación de la señal Wnt de cada pocillo, y se calculó una concentración (IC₅₀) que se requiere para inhibir la actividad de la señal Wnt de una sustancia de interés en un 50%, en el que la luminosidad de un pocillo al que no se le añadió una disolución de muestra y se le añadió LiCl se definió como una actividad de señal Wnt del 100%, y la luminosidad de un pocillo al que no se le añadió una disolución de muestra o LiCl se definió como una actividad de señal Wnt del 0%. La IC₅₀ del compuesto del Ejemplo 1 fue 0,06 µM.

Ejemplo 2 de ensayo: Efecto de la regresión de los pólipos del intestino delgado en ratón APC^{Min/+}

Un gen APC (un gen de poliposis coli adenomatosa), un factor de regulación de la degradación de la señal Wnt, se denomina “gen supresor del cáncer colorrectal”, y es un gen causal de la poliposis adenomatosa familiar. Si se produce una mutación en el gen APC, una célula de la mucosa colorrectal comienza a proliferar desordenadamente para formar pólipos colorrectales que pueden denominarse lesión precancerosa. Así, se sabe que el gen tiene un papel importante en la etapa inicial de un proceso de comienzo de cáncer colorrectal.

En un ratón en el que el gen APC está mutado (un ratón APC^{Min/+}), se desarrollan muchos pólipos en el tracto intestinal como un paciente con poliposis adenomatosa familiar. Por tanto, el ratón es útil para esclarecer el mecanismo de la aparición o invasión del cáncer basado en una señal WNT, y es un modelo estándar que se ha usado para los estudios de prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer colorrectal.

Los ratones APC^{Min/+} (C57BL/6J-APC^{<Min>}/J Hetero, hembra, Sunplanet Co., Ltd.) se agruparon de modo que el promedio de los pesos corporales de los ratones en un grupo se volviera casi igual entre sí en el primer día de la administración. Se preparó un analito disolviendo una sustancia de ensayo (compuesto de Ejemplo) en HCl 0,1 N para que la concentración se convirtiera en la concentración de administración deseada, y después se almacenó en un frigorífico a 4°C. A un grupo de control (vehículo), se le administró un disolvente de administración por vía oral en las mismas condiciones que un material de ensayo. El analito se administró de forma continua por vía oral en dosis de 50 mg/kg y 75 mg/kg dos veces al día durante 4 días, y los tres días siguientes se proporcionaron como reposos farmacológicos. Este procedimiento se definió como un ciclo, y la administración se realizó durante 16 días en total (es decir, 4 días x 4 ciclos). El experimento se llevó a cabo en 6 a 7 ratones por grupo. Con respecto a cada uno del grupo de control y del grupo al que se administró la sustancia de ensayo, se calculó el valor del peso corporal del último día con respecto al peso corporal del primer día (es decir, un peso corporal relativo: RBW). Un grupo al que se administró la sustancia de ensayo, del que el (RBW del grupo al que se administró la sustancia de ensayo)/(RBW del grupo de control) fue 0,8 o más, se determinó como un grupo que podría administrarse de forma segura. Con respecto al grupo al que se administró la sustancia de ensayo, el número real de pólipos después de la administración de la sustancia de ensayo y el error estándar del número real en comparación con el número de pólipos en el control en el último día (es decir, el día 25 contado desde el primer día de la administración) se muestran en la Figura 1. En este ensayo, se contaron los pólipos formados en el intestino delgado y el colon. Se llevó a cabo un análisis estadístico (prueba de Dunnett) del grupo al que se administró la sustancia de ensayo con respecto al grupo de control, y se dio a conocer un valor de P.

Ejemplo 3 de ensayo: Efecto antitumoral en el modelo de trasplante subcutáneo de K562 humana

Una preparación de una cepa de células de leucemia mielogenosa crónica humana K562 (que se había cultivado en un medio de cultivo líquido RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y penicilina/estreptomina), que se preparó con PBS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; n° de Cat 045-29795) de manera que la densidad se convirtió en 2 x 10⁸ células/ml, se mezcló con MATRIGEL (BD Bioscience, n° de Cat: 354234) en una relación de mezclamiento de 1:1, preparando así una suspensión celular que tiene una densidad de 1 x 10⁸ células/ml. La suspensión celular resultante se trasplantó por vía subcutánea en el flanco derecho de cada uno de los ratones atímicos de seis semanas de edad (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrIcrlj, hembras, Charles River Laboratories Japan) a una dosis de 100 µl. Siete días después del trasplante, se midieron el diámetro más corto y el diámetro más largo de un tumor usando un calibre digital electrónico (Digimatic TM Caliper, Mitutoyo Corporation) para calcular el volumen del tumor según la siguiente ecuación.

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{diámetro más largo (mm)}) \times (\text{diámetro más corto (mm)}) \times (\text{diámetro más corto (mm)})/2$$

Los ratones se agruparon de tal manera que el valor promedio de los volúmenes tumorales en ratones en un grupo, que se determinaron sobre la base del volumen tumoral el primer día de la administración. Se preparó un analito disolviendo un compuesto del Ejemplo 1 en HCl 0,1 N de modo que la cantidad de dosis fuera de 10 ml/kg. Se preparó una disolución para la administración de Dasatinib disolviendo Dasatinib, Base Libre (LC Laboratories, n° de Cat.: D-3307) en una disolución 1:1 de agua destilada de Otsuka (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., n° de cat.: 1324) y PROPYLENE GLYCOL (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., n° de cat.: 164-04996) de modo que la cantidad de dosis se convirtió en 10 ml/kg. Se administró un analito por vía oral de forma continua durante 5 días partiendo desde el primer día de la administración en dos dosis divididas al día (bid). Se administró una disolución de administración de Dasatinib por vía oral una vez al día (qd) durante 5 días de forma continua, y se establecieron los siguientes dos días de reposo farmacológico. Este procedimiento se definió como un ciclo, y la administración se realizó en dos ciclos en total. Un grupo de control era un grupo al que no se le administró ningún compuesto de ejemplo. En el experimento, un grupo incluye 9 a 10 ratones. Con respecto al grupo de control, a un grupo al que solo se administró un compuesto de ejemplo, a un grupo al que solo se administró Dasatinib, y a un grupo al que se administraron tanto un compuesto de Ejemplo como Dasatinib (en lo sucesivo denominado “grupo administrado combinado”), los volúmenes tumorales y los pesos corporales se midieron a lo largo del tiempo durante un período desde el primer día hasta el día 28. Con respecto al grupo de control y al grupo al que solo se administró el compuesto del Ejemplo, la medida se llevó a cabo durante un período desde el primer día hasta el undécimo día. En cada medida, se calculó un volumen tumoral (un volumen tumoral relativo: RTV) y un peso corporal (un peso corporal relativo: RBW) con respecto a los valores del primer día, y los gráficos determinados durante un período desde el primer día de la administración hasta el día 28 se

muestran en las Figs. 2 y 3. Además, se llevó a cabo un análisis estadístico (prueba de Dunnett) en el grupo al que se administraron tanto el compuesto del Ejemplo como Dasatinib, en comparación con el grupo al que solo se administró Dasatinib, usando un valor de RTV el día 28, y un grupo de los cuales el valor de P fue de 0,05 o menos se marcó con un asterisco (*). Además, en la Tabla 6 también se muestra el número de individuos en los que no se observó un tumor mediante juicio visual y era impalpable (es decir, que tenían un tumor no palpable) el día 28. En este momento, un análisis estadístico (prueba de Fisher) se llevó a cabo en el grupo al que se administraron tanto el compuesto del Ejemplo como Dasatinib en comparación con el grupo al que solo se administró Dasatinib, y un grupo cuyo valor de P era 0,05 o menos se marcó con un asterisco (*), y un grupo en el cual el valor de P es 0,01 o menos se marcó con asteriscos (***).

[Tabla 1]

Compuesto administrado	el número de individuos en los que no se observó un tumor mediante juicio visual / número total de individuos administrados
Vehículo	0/10
Dasatinib 5 mg/kg	0/9
Dasatinib 5 mg/kg + Compuesto del Ejemplo 1 35 mg/kg	6/10*
Dasatinib 5 mg/kg + Compuesto del Ejemplo 1 50 mg/kg	9/10***
Dasatinib 5 mg/kg + Compuesto del Ejemplo 1 75 mg/kg	10/10***

Ejemplo 4 de ensayo: Difracción de rayos X de polvo

El cristal del Compuesto 1 obtenido en el Ejemplo 2 se colocó en la platina de muestra de un aparato de difracción de rayos X de polvo, y se analizó en las siguientes condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 4.

(Condiciones de medida)

Diana: cobre

Detector: contador de centelleo

Voltaje del tubo: 50 kV

Corriente del tubo: 300 mA

Ranura: ranura divergente: 0,5 mm; ranura de dispersión: abierta; ranura receptora de luz: abierta

Velocidad de barrido: 5°/minuto

Intervalo de muestreo: 0,02°

Intervalo de barrido: 5° a 35°

Soporte de muestra: soporte de aluminio

Ejemplo 5 de ensayo: Análisis térmico

El cristal obtenido en el Ejemplo 2 se pesó con precisión en una bandeja de muestra de aluminio, y se sometió a termogravimetría (TG) y análisis térmico diferencial (DTA) en las siguientes condiciones.

Los resultados se muestran en la Figura 5.

(Condiciones de medida)

Atmósfera: menos de 40 ml/minuto de caudal de gas nitrógeno

Referencia: bandeja de muestra de aluminio vacía

Velocidad de calentamiento: 10°C/minuto

Intervalo de muestreo: 1 segundo

Intervalo de temperatura de medida: 40 a 300°C

Ejemplo 6 de ensayo: espectro de RMN ¹³C en estado sólido

El espectro de RMN ¹³C en estado sólido se midió en las siguientes condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 6.

5 (Condiciones de medida)

Aparato usado: Avance400MHz (fabricado por BRUKER) Sonda CPMAS de 7 mm (fabricado por BRUKER)

Núcleo medido: ¹³C (frecuencia de resonancia 100,6248425 MHz)

Temperatura de medida: temperatura ambiente (22°C)

Modo de pulso: medida CPTOSS

10 Número de rotación: 5.000 Hz

Tiempo de repetición de pulso: 4 segundos

Tiempo de contacto: 1 milisegundo

Número de barrido: 8.000

Material de referencia: glicina (referencia externa: 176,03 ppm)

15 El espectro de RMN ¹³C en estado sólido se obtuvo mediante el método CPTOSS (un método para eliminar las bandas laterales giratorias) con núcleo de carbono (frecuencia de resonancia 100,6 MHz) usando un instrumento de RMN, BRUKER Avance 400MHz equipado con una sonda CPMAS de 7 mm (fabricada por BRUKER). El tubo de muestra que contenía aproximadamente 300 mg de una muestra sólida se hizo girar a 5 kHz, y se midió usando un tiempo de contacto de 1 milisegundo, un tiempo de retardo de pulso de 4 segundos, y un número de barridos de 8000 a
20 temperatura ambiente (22°C). Los desplazamientos químicos se corrigieron mediante un método de referencia externa, siendo el carbono carbonílico de la glicina 176,03 ppm.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eisai R&D Management Co. Ltd.

25 <120> Cristal del compuesto (6S,9aS)-N-bencil-6-[(4-hidroxifenil)metil]-4,7-dioxo-8-({6-[3-(piperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il)metil}-2-(prop-2-en-1-il)-octahidro-1H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1-carboxamida

<130> FP15-0750-00

<150> 62/183577

<151> 2015-06-23

<160> 2

30 <170> Patente en versión 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> BEHKS-F

<400> 1

gatctgaatt caagcttctc gaggttacct ctagagagct cgc 43

<210> 2

40 <211> 43

ES 2 870 013 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BEHKS-R

5

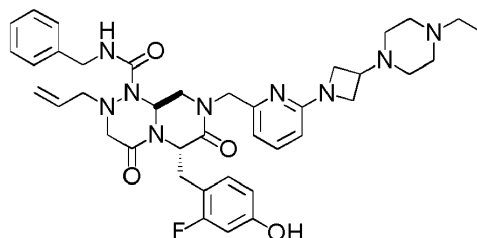
<400> 2

ggccgcgagc tctctagagg taccctcgag aagcttgaat tca

43

REIVINDICACIONES

1. Un cristal de (6S,9aS)-N-bencil-8-({6-[3-(4-etilpiperazin-1-il)azetidin-1-il]piridin-2-il}metil)-6-(2-fluoro-4-hidroxibencil)-4,7-dioxo-2-(prop-2-en-1-il)hexahidro-2H-pirazino[2,1-c][1,2,4]triazin-1(6H)-carboxamida



- 5 en el que el cristal tiene un pico de difracción en el ángulo de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.
2. El cristal según la reivindicación 1, en el que el cristal tiene picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $5,8^\circ$, $6,4^\circ$ y $10,1^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.
- 10 3. El cristal según la reivindicación 2, en el que el cristal tiene además picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $8,0^\circ$ y $12,8^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.
4. El cristal según la reivindicación 3, en el que el cristal tiene además picos de difracción a los ángulos de difracción ($2\theta \pm 0,2^\circ$) de $14,2^\circ$, $16,0^\circ$, $18,9^\circ$, $19,7^\circ$ y $23,1^\circ$ en difracción de rayos X de polvo.
5. El cristal según las reivindicaciones 1-4, en el que el cristal tiene un pico en el desplazamiento químico ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $154,7$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.
- 15 6. El cristal según las reivindicaciones 1-5, en el que el cristal tiene además picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $141,1$ ppm y $158,1$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.
7. El cristal según las reivindicaciones 1-6, en el que el cristal tiene además picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $134,0$ ppm y $165,1$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.
- 20 8. El cristal según las reivindicaciones 1-7, en el que el cristal tiene además picos en los desplazamientos químicos ($\delta \pm 0,5$ ppm) de $12,6$ ppm, $55,5$ ppm y $118,5$ ppm en el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido.
9. El cristal según las reivindicaciones 1-8, en el que el cristal tiene sustancialmente el mismo patrón de difracción de rayos X de polvo que se muestra en la FIG. 4.
10. El cristal según las reivindicaciones 1-9, en el que el cristal tiene sustancialmente el mismo espectro de RMN ^{13}C en estado sólido como se muestra en la FIG. 6.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende un cristal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

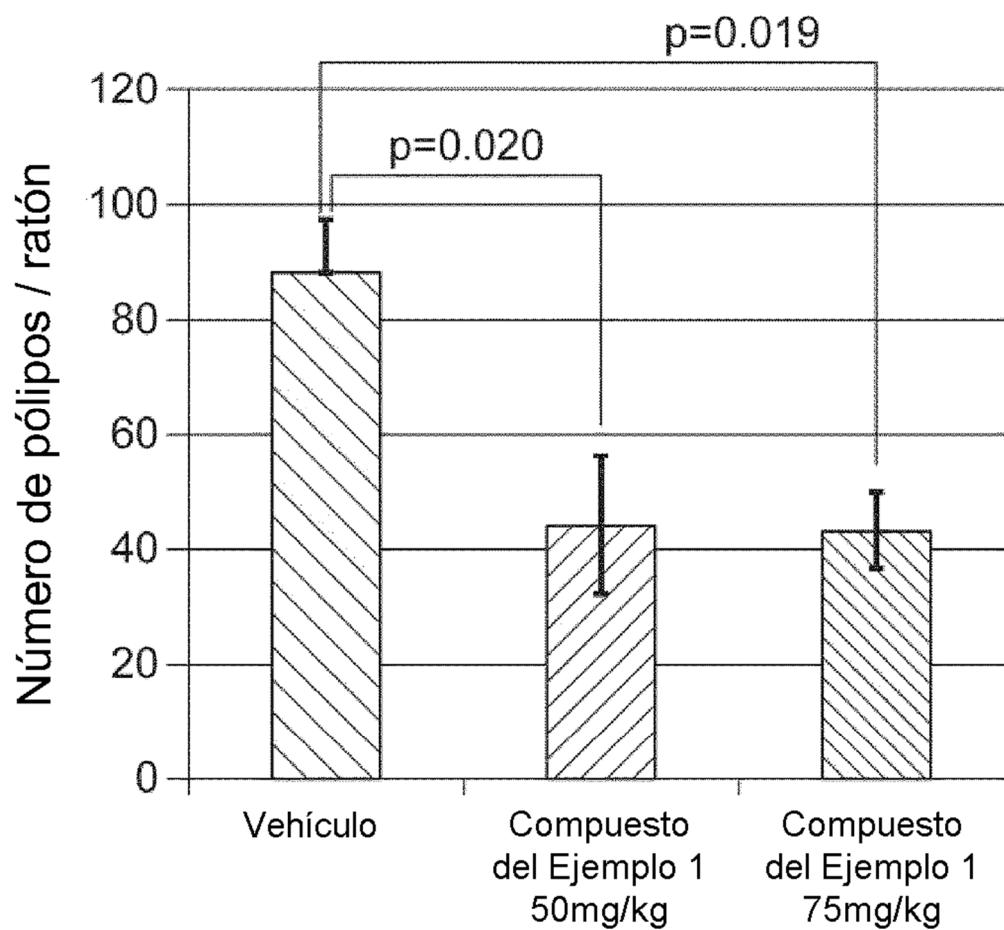
Fig.1

Fig.2

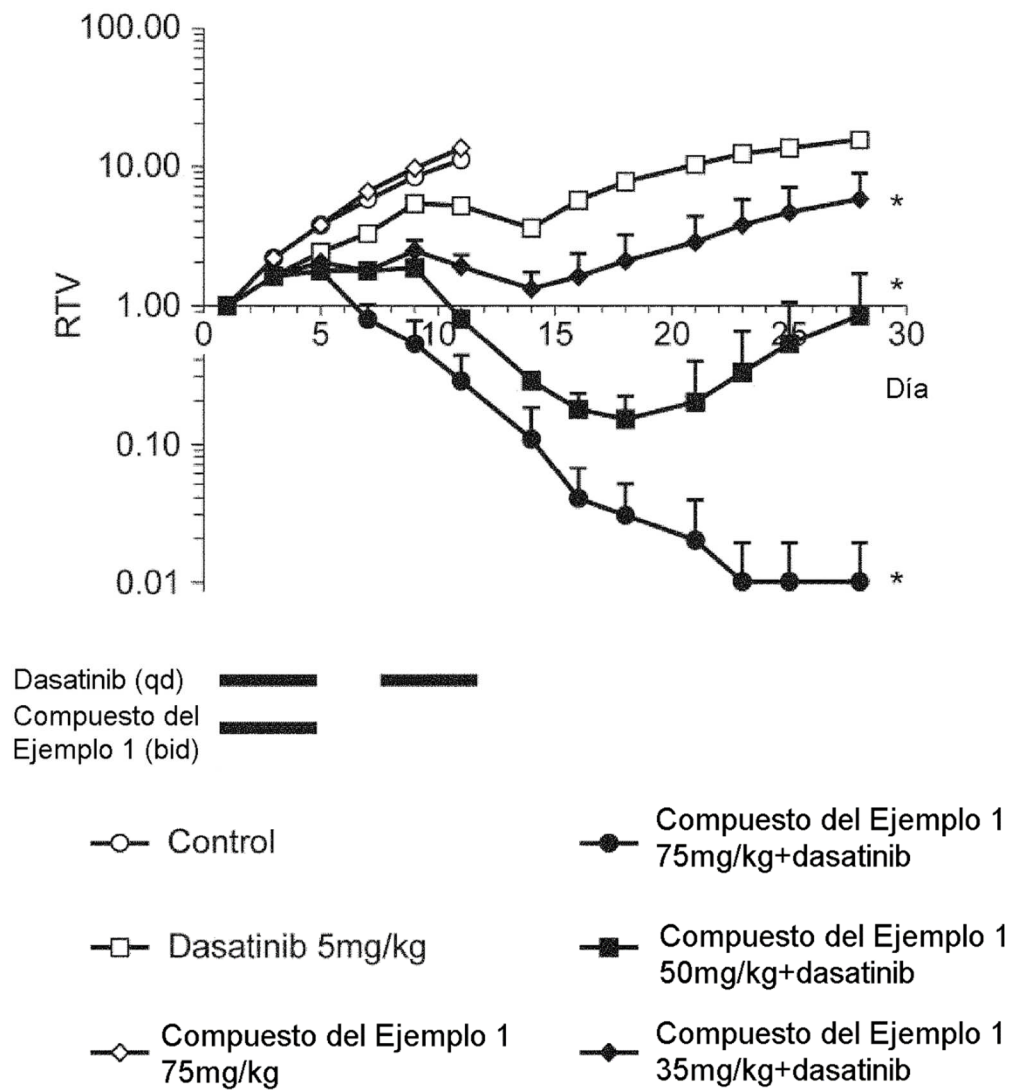


Fig.3

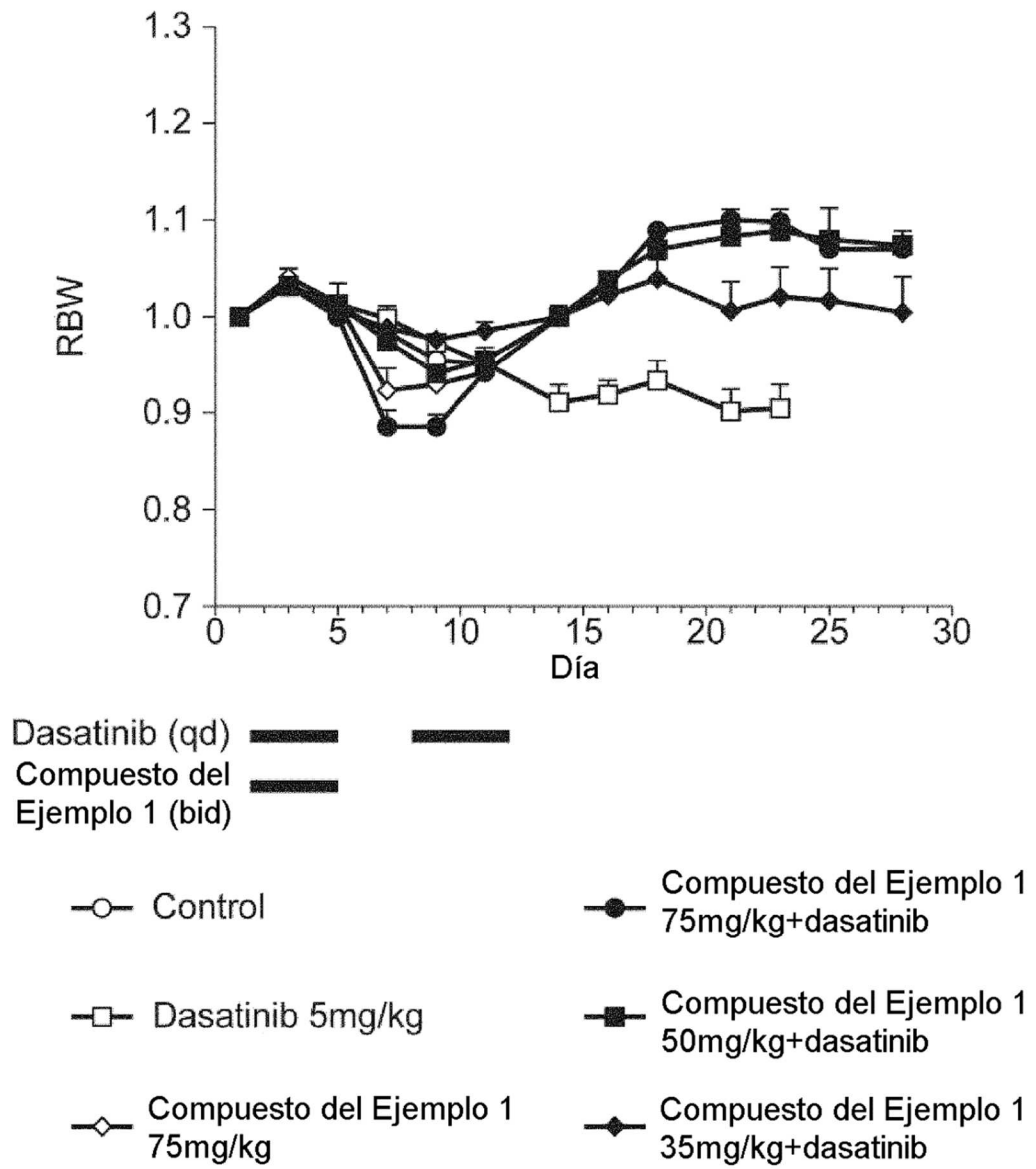


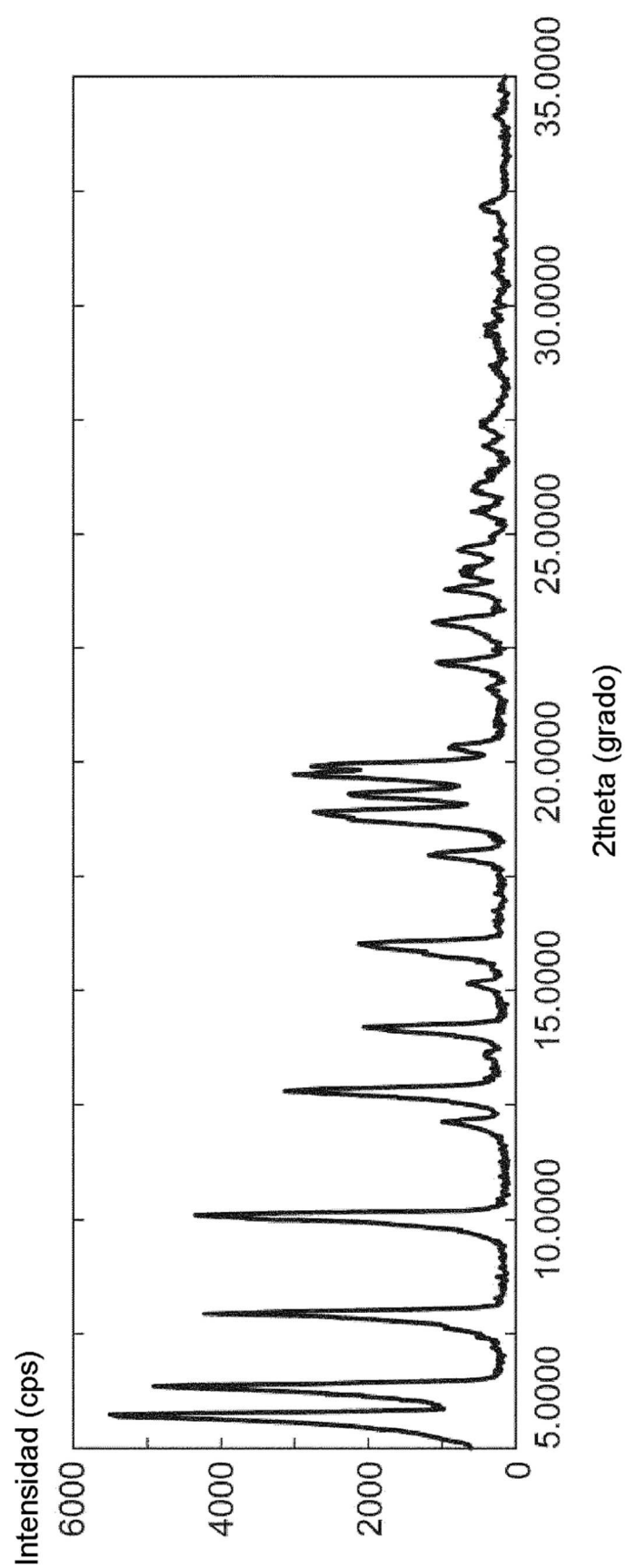
Fig.4

Fig.5

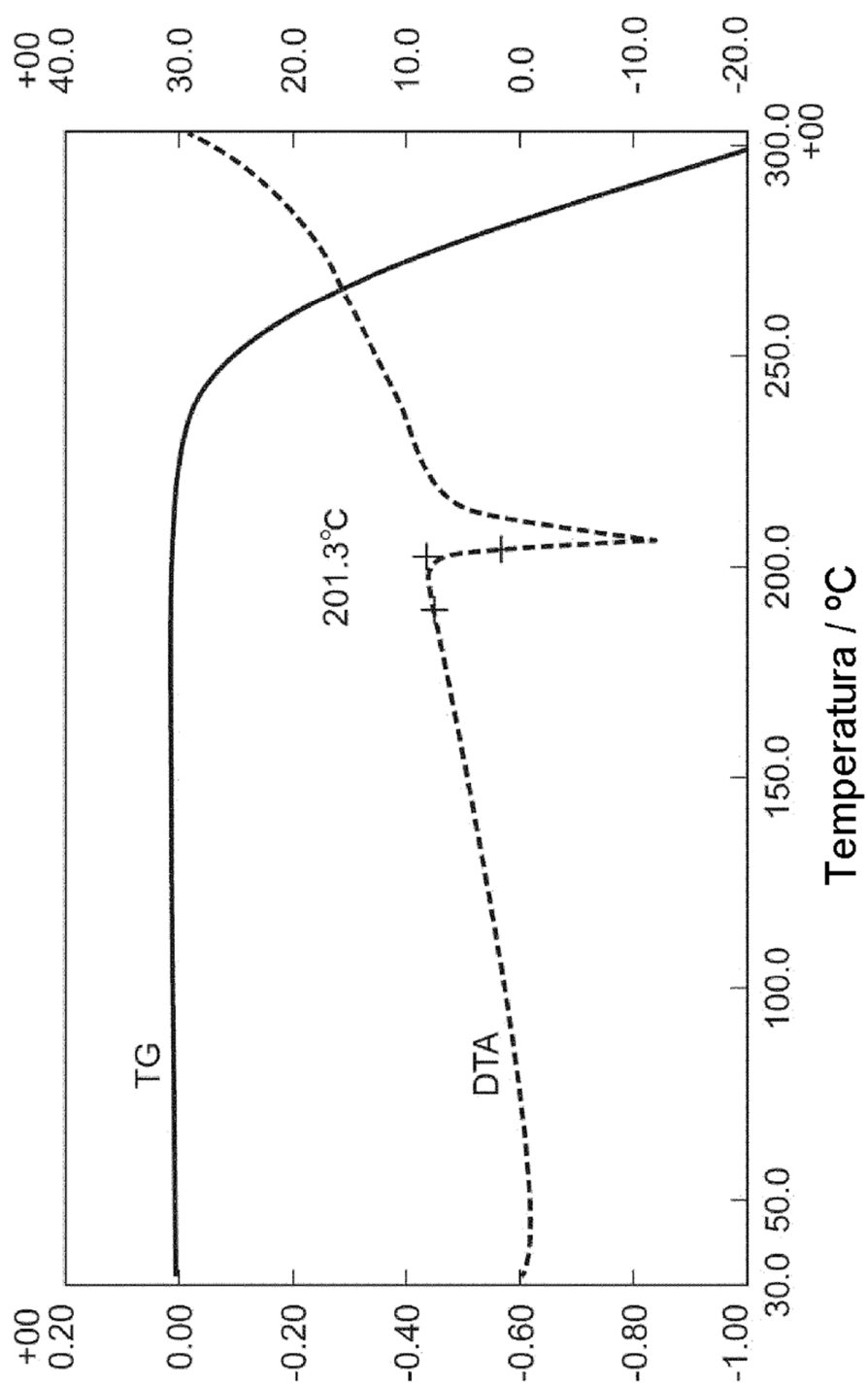


Fig.6