

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 437**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2017** **PCT/JP2017/042437**
87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2018** **WO18097295**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2017** **E 17873876 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.01.2022** **EP 3546456**

54 Título: **Cristal de derivado de pirido[3,4-d]pirimidina o solvato del mismo**

30 Prioridad:

28.11.2016 JP 2016229973

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2022

73 Titular/es:

TEIJIN PHARMA LIMITED (100.0%)
2-1, Kasumigaseki 3-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, JP

72 Inventor/es:

MIYAMOTO, HIDETOSHI;
MIZUNO, TSUYOSHI;
UNOKI, GEN;
MIYAZAWA, YUKI y
YAJIMA, NAOKI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 905 437 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 derivado de pirido[3,4-d]pirimidina o solvato del mismo

Campo

- 5 La presente invención se refiere a cristales de un derivado de pirido[3,4-d]pirimidina o un solvato del mismo que tienen actividad inhibidora contra la quinasa 4 dependiente de ciclina y/o la quinasa 6 dependiente de ciclina (aquí en lo sucesivo también denominadas "CDK4/6") y son útiles para la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide, la arteriosclerosis, la fibrosis pulmonar, el infarto cerebral y/o el cáncer.

Antecedentes

- 10 Los inhibidores de CDK4/6 se pueden usar para tratar varias enfermedades causadas por un crecimiento celular anómalo, incluidos el cáncer, los trastornos cardiovasculares, las enfermedades renales, las infecciones específicas y las enfermedades autoinmunes, y se espera que sean eficaces en el tratamiento de la artritis reumatoide, la arteriosclerosis, la fibrosis pulmonar, el infarto cerebral y el cáncer. Las razones por las que se espera que la detención del ciclo celular y la inhibición del crecimiento celular a través de la inhibición de CDK sean eficaces en el tratamiento de estas afecciones se basan en el siguiente hallazgo técnico.
- 15 Se sabe que la artritis reumatoide implica la formación de pannus a través de la hiperproliferación de células sinoviales. Se ha dado a conocer que esta hiperproliferación se puede reducir mediante la administración de un inhibidor de CDK4/6 al animal (LNP 1). Un complejo CDK4-ciclina D regula la producción de MMP3 en células sinoviales derivadas de un paciente con artritis reumatoide. La regulación negativa de la actividad de CDK4/6 inhibe no solo la proliferación sino también la producción de MMP3 (LNP 2).
- 20 Por lo tanto, se espera que los inhibidores de CDK4/6 presenten tanto un efecto inhibidor sobre la proliferación de células sinoviales como un efecto protector del cartílago en la artritis reumatoide.
- La inducción de la expresión de la proteína p21 inhibidora del ciclo celular con un vector adenoviral es eficaz en un modelo murino de fibrosis pulmonar (LNP 3).
- 25 Se sabe que el nivel de ciclina D1/CDK4 aumenta en un modelo de infarto cerebral de rata en asociación con la muerte neuronal provocada por la isquemia local. La muerte neuronal se reduce administrando flavopiridol, que es un inhibidor no selectivo de CDK (LNP 4).
- 30 La cascada de ciclina D-CDK4/6-INK4a-Rb se detecta con frecuencia en el cáncer humano causado por la anomalía de cualquier factor que contribuya al crecimiento de las células cancerosas, tal como la pérdida de p16INK4a funcional, la sobreexpresión de ciclina D1, la sobreexpresión de CDK4 o la pérdida de Rb funcional (LNP 5). Tal anomalía promueve la progresión del ciclo celular desde la fase G1 hasta la fase S, y esta cascada ciertamente desempeña un papel importante en la transformación oncogénica o el crecimiento anómalo de las células cancerosas.
- 35 Los inhibidores de CDK4/6 pueden ser efectivos, particularmente para tumores que involucran anomalías en genes que activan la actividad de las quinasa CDK4/6, tales como cánceres que involucran la translocación de ciclina D, cánceres que involucran la amplificación de ciclina D, cánceres que involucran la amplificación o sobreexpresión de CDK4 o CDK6, y cánceres que implican la inactivación de p16. Los inhibidores de CDK4/6 pueden ser efectivos para el tratamiento de cánceres que involucran anomalías genéticas en el regulador aguas arriba de la ciclina D, cuya cantidad aumenta debido a defectos en el regulador aguas arriba.
- De hecho, se han sintetizado y descrito en la técnica muchos compuestos que inhiben la actividad de CDK4/6, y dichos compuestos se han probado clínicamente para el tratamiento de cánceres, como el cáncer de mama (LNP 6).
- 40 La mayoría de las toxicidades radioterapéuticas y quimioterapéuticas agudas y graves son causadas por los efectos sobre las células madre y las células progenitoras. Un inhibidor de CDK4/6 provoca la detención temporal del ciclo celular de las células madre y progenitoras hematopoyéticas y las protege de la citotoxicidad radioterapéutica o quimioterapéutica. Después del tratamiento con el inhibidor, las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) regresan de su estado de latencia temporal y luego funcionan normalmente. Por lo tanto, se espera que la resistencia a la quimioterapia con el uso de un inhibidor de CDK4/6 proporcione una protección significativa de la médula ósea (LNP 7).
- 45 Por lo tanto, se espera que los inhibidores de CDK4/6 sean efectivos para el tratamiento de, por ejemplo, artritis reumatoide, arterioesclerosis, fibrosis pulmonar, infarto cerebral o cáncer y para la protección de la médula ósea, en particular, para el tratamiento de artritis reumatoide o cáncer y la protección de la médula ósea.
- 50 Los inhibidores de CDK, incluido CDK4/6, se describen en las LPT 1 y 2.

Lista de citas**Literatura de patentes**

[LPT1] WO2003/062236A

[LPT2] WO2010/020675A

5 Literatura no de patentes

[LNP 1] Taniguchi, K et al., Nature Medicine, Vol.5, p.760-767 (1999)

[LNP 2] Nonomura Y et al., Arthritis & Rheumatology 2006, julio; 54 (7): p.2074-83

[LNP 3] American Journal Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004, vol. 286, p.L727-L733

10 [LNP 4] Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, 2000, Vol.97, p. 10254-10259

[LNP 5] Science, vol. 254, pág. 1138-1146 (1991)

[LNP 6] Guha M, Nature Biotechnology 2013, marzo; 31 (3): pág. 187

[LNP 7] Revista de Investigación Clínica 2010; 120 (7): p.2528-2536

Breve exposición de la invención**15 Problema que se resuelve con la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo cristal de un derivado de pirido[3,4-d]pirimidina o un solvato del mismo que muestra una excelente actividad inhibidora de CDK4/6.

Medios para solucionar el problema

20 Habiendo realizado extensos estudios para lograr el objeto anterior, los presentes inventores han descubierto que ciertos derivados de pirido[3,4-d]pirimidina que tienen estructuras específicas presentan una excelente actividad inhibidora de CDK4/6.

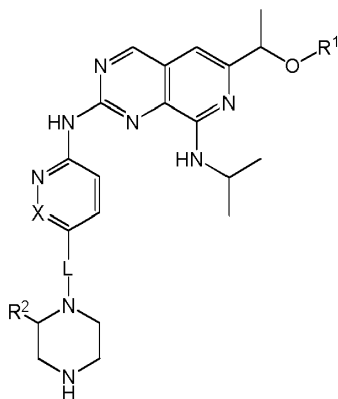
Los presentes inventores también han encontrado que algunos de estos compuestos pueden formar cristales que son químicamente estables y adecuados como principios farmacéuticos activos.

25 Por tanto, la presente invención se refiere a un cristal de un compuesto representado por la fórmula (I) o un solvato del mismo, en el que el compuesto representado por la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:

1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona;

1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina; y

(R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina.



30 En la fórmula, R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo oxo (en el caso de un grupo oxo, R² está unido al anillo de piperazina a través de un doble enlace), L representa un enlace simple o un grupo alquilenos C₁₋₃, y X representa CH o N; siempre que el compuesto representado por la fórmula (I) se seleccione del grupo que consiste en:

1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona;
 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina; y
 (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina.

Efecto de la invención

- 5 La presente invención proporciona un cristal de un derivado de pirido[3,4-d]pirimidina o un solvato del mismo que muestra una excelente actividad inhibidora de CDK4/6 y es útil como fármaco profiláctico o terapéutico de, por ejemplo, artritis reumatoide, arteriosclerosis, fibrosis pulmonar, infarto cerebral y/o cáncer.

El cristal según la presente invención se puede utilizar como ingrediente farmacéutico activo en la fabricación de un producto farmacéutico.

10 Breve descripción de los dibujos

[FIG.1] La Figura 1 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal D de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

[FIG.2] La Figura 2 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal A de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

- 15 [FIG.3] La Figura 3 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal A de 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

[FIG.4] La Figura 4 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal B de 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

- 20 [FIG.5] La Figura 5 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal A de (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidin-2,8-diamina.

[FIG.6] La Figura 6 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal B de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

- 25 [FIG.7] La Figura 7 es un espectro de difracción de rayos X en polvo de un cristal (cristal C) de un solvato de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona con sulfóxido de dimetilo.

[FIG.8] La Figura 8 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal I de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

[FIG.9] La Figura 9 es un espectro de difracción de rayos X en polvo del cristal C de 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

- 30 [FIG. 10] La Figura 10 es un espectro de absorción infrarroja del cristal D de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

[FIG. 11] La Figura 11 es un espectro de absorción infrarroja del cristal A de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

- 35 [FIG. 12] La Figura 12 es un espectro de absorción infrarroja de un cristal (cristal C) de un solvato de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona con dimetil sulfóxido.

[FIG. 13] La Figura 13 es un espectro de absorción infrarroja del cristal I de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

[FIG. 14] La Figura 14 es un espectro de absorción infrarroja del cristal A de 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

- 40 [FIG. 15] La Figura 15 es un espectro de absorción infrarroja del cristal C de 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

[FIG. 16] La Figura 16 es un espectro de absorción infrarroja del cristal A de (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina.

- 45 [FIG. 17] Las Figuras 17-1 y 17-2 son espectros de RMN en estado sólido (¹³C) de cristal D de 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona. La figura 17-1 es un espectro obtenido en el modo de 6.500 Hz y la figura 17-2 es un espectro obtenido en el modo de 14.000 Hz.

[FIG. 18] La figura 18 es un espectro de RMN en estado sólido (^{15}N) de cristal D de 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

[FIG. 19] Las figuras 19-1 y 19-2 son espectros de RMN en estado sólido (^{13}C) del cristal A de 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona. La figura 19-1 es un espectro obtenido en el modo de 6.500 Hz y la figura 19-2 es un espectro obtenido en el modo de 14.000 Hz.

[FIG.20] La figura 20 es un espectro de RMN en estado sólido (^{15}N) del cristal A de 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

[FIG.21] Las Figuras 21-1 y 21-2 son espectros de RMN en estado sólido (^{13}C) del cristal A de 1-(6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina. La Figura 21-1 es un espectro obtenido en el modo de 6.500 Hz y la Figura 21-2 es un espectro obtenido en el modo de 14.000 Hz.

[FIG.22] La figura 22 es un espectro de RMN en estado sólido (^{15}N) del cristal A de 1-(6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

[FIG.23] Las figuras 23-1 y 23-2 son espectros de RMN en estado sólido (^{13}C) del cristal A de (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina. La figura 23-1 es un espectro obtenido en el modo de 6.500 Hz y la figura 23-2 es un espectro obtenido en el modo de 14.000 Hz.

[FIG.24] La figura 24 es un espectro de RMN en estado sólido (^{15}N) del cristal A de (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina.

Modos de realizar la invención

Los cristales según la presente invención se caracterizan por espectrometría de difracción de rayos X (XRD) en polvo, calorimetría diferencial de barrido (CDB), espectrometría de absorción infrarroja por transformada de Fourier (en lo sucesivo denominada "espectro de absorción infrarroja") y/o espectrometría RMN en estado sólido. Los espectros de difracción de rayos X en polvo (XRD) de estos cristales presentan patrones característicos, cada uno de estos cristales tiene valores específicos en un ángulo de difracción de 2θ . Estos cristales también presentan comportamientos térmicos característicos según la calorimetría diferencial de barrido (CDB). Los espectros de absorción de infrarrojos de estos cristales presentan patrones característicos, cada uno de estos cristales tiene un espectro de absorción de infrarrojos específico con un número de onda característico. Los espectros de RMN de C^{13} en estado sólido de estos cristales presentan patrones característicos, cada uno de estos cristales tiene desplazamientos químicos específicos (ppm). Los espectros de RMN de N^{15} en estado sólido de estos cristales presentan patrones característicos, cada uno de estos cristales tiene desplazamientos químicos específicos (ppm).

Si bien la presente descripción abarca cualquier cristal de un compuesto representado por la fórmula (I), la siguiente descripción se centrará en las realizaciones según la invención, que incluyen nueve cristales de los siguientes tres compuestos:

- 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona (en lo sucesivo también denominado "Compuesto (a)");
- 1-(6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidina-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina (en lo sucesivo también denominado como "Compuesto (b)"); y
- (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina (en lo sucesivo también denominado "Compuesto (c)").

El cristal D del Compuesto (a) presenta picos característicos en los ángulos de difracción $2\theta = 6,3^\circ, 6,6^\circ, 11,6^\circ, 16,9^\circ$ y $20,0^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal D del Compuesto (a) presenta un patrón como se muestra en la Figura 1 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

El cristal D del Compuesto (a) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 277°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El cristal D del Compuesto (a) presenta picos de absorción en números de onda de 703 cm^{-1} , 896 cm^{-1} y 3418 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo característico obtenido según el método KBrtab. El cristal D del Compuesto (a) también presenta un gráfico de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 10.

El cristal D del Compuesto (a) presenta desplazamientos químicos de 136,0 ppm, 111,2 ppm, 105,1 ppm, 101,8 ppm, 52,7 ppm, 49,6 ppm, 42,9 ppm, 23,8 ppm y 18,5 ppm en un Espectro de RMN C^{13} en estado sólido. El cristal D del Compuesto (a) también presenta un gráfico de espectro de RMN C^{13} en estado sólido como se muestra en la Figura 17-1 (6.500 Hz) y la Figura 17-2 (14.000 Hz).

El cristal D del Compuesto (a) presenta desplazamientos químicos a 248,6 ppm, 245,7 ppm, 229,2 ppm, 214,5 ppm, 174,3 ppm, 86,5 ppm, 54,7 ppm y -12,4 ppm en un espectro de RMN N^{15} en estado sólido. El cristal D del Compuesto

(a) también presenta un gráfico de espectro de RMN N^{15} en estado sólido como se muestra en la Figura 18.

El cristal A del Compuesto (a) muestra picos característicos en los ángulos de difracción $2\theta = 5,3^\circ, 7,3^\circ, 10,3^\circ, 15,1^\circ$ y $17,4^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal A del Compuesto (a) también presenta un patrón como se muestra en la Figura 2 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

- 5 El cristal A del Compuesto (a) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 277°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El cristal A del Compuesto (a) presenta picos de absorción en números de onda de 874 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} y 3314 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo característico obtenido según el método KBrtable. El cristal A del Compuesto (a) también presenta un gráfico de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 11.

- 10 El cristal A del Compuesto (a) presenta desplazamientos químicos de $154,7\text{ ppm}$, $138,8\text{ ppm}$, $133,6\text{ ppm}$, $113,2\text{ ppm}$, $101,6\text{ ppm}$, $100,4\text{ ppm}$, $67,4\text{ ppm}$, $51,8\text{ ppm}$, $26,6\text{ ppm}$ y $23,3\text{ ppm}$ en un espectro de RMN C^{13} en estado sólido. El cristal D del Compuesto (a) también presenta un gráfico de espectro de RMN C^{13} en estado sólido como se muestra en la Figura 19-1 (6.500 Hz) y la Figura 19-2 (14.000 Hz).

- 15 El cristal A del Compuesto (a) presenta desplazamientos químicos a $243,6\text{ ppm}$, $86,7\text{ ppm}$, $56,7\text{ ppm}$ y $-12,4\text{ ppm}$ en un espectro de RMN N^{15} en estado sólido. El cristal A del Compuesto (a) también presenta un gráfico de espectro RMN N^{15} en estado sólido como se muestra en la Figura 20.

El cristal B del Compuesto (a) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 5,3^\circ, 6,0^\circ, 6,7^\circ, 10,4^\circ$ y $20,8^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal B del Compuesto (a) también presenta un patrón como se muestra en la Figura 6 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

- 20 El cristal B del Compuesto (a) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 271°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El cristal C del Compuesto (a) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 6,0^\circ, 10,0^\circ, 13,7^\circ, 20,3^\circ$ y $23,0^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal C del Compuesto (a) también presenta un patrón como se muestra en la Figura 7 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

- 25 El cristal C del Compuesto (a) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 100°C y 278°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El cristal C del Compuesto (a) presenta picos de absorción en números de onda de 840 cm^{-1} , 904 cm^{-1} , 955 cm^{-1} , 1490 cm^{-1} y 3281 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo obtenido según el método KBrtable. El cristal C del Compuesto (a) también presenta un gráfico de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 12.

- 30 El cristal I del Compuesto (a) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 7,2^\circ, 9,5^\circ, 14,5^\circ, 16,5^\circ, 20,9^\circ, 25,0^\circ$ y $27,9^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal I del Compuesto (a) también presenta un patrón como se muestra en la Figura 8 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

El cristal I del Compuesto (a) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 272°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

- 35 El cristal I del Compuesto (a) presenta picos de absorción en números de onda de 1081 cm^{-1} y 1260 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo obtenido según el método KBrtable. El cristal I del Compuesto (a) también presenta un diagrama de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 13.

- 40 El cristal A del Compuesto (b) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,5^\circ, 15,2^\circ, 16,9^\circ, 20,1^\circ, 21,0^\circ, 23,3^\circ$ y $26,6^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal A del Compuesto (b) también presenta un patrón como se muestra en la Figura 3 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

El cristal A del Compuesto (b) muestra un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 225°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

- 45 El cristal A del Compuesto (b) presenta picos de absorción en números de onda de 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo. El cristal A del Compuesto (b) presenta un diagrama de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 14.

El cristal A del Compuesto (b) presenta desplazamientos químicos de $163,4\text{ ppm}$, $157,6\text{ ppm}$, $155,5\text{ ppm}$, $117,8\text{ ppm}$, $82,2\text{ ppm}$, $56,1\text{ ppm}$ y $42,3\text{ ppm}$ en un espectro de RMN C^{13} en estado sólido. El cristal A del Compuesto (b) también presenta un gráfico de espectro de RMN C^{13} en estado sólido como se muestra en la Figura 21-1 (6.500 Hz) y la Figura 21-2 (14.000 Hz).

- 50 El cristal A del Compuesto (b) presenta desplazamientos químicos a $311,7\text{ ppm}$, $232,4\text{ ppm}$, $168,5\text{ ppm}$, $79,5\text{ ppm}$, $53,3\text{ ppm}$, $32,9\text{ ppm}$ y $-4,3\text{ ppm}$ en un espectro de RMN de N^{15} en estado sólido. El cristal A del Compuesto (b) también

presenta un gráfico de espectro NMR N^{15} en estado sólido como se muestra en la Figura 22.

El cristal B del Compuesto (b) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 6,6^\circ, 8,1^\circ, 15,2^\circ, 15,9^\circ, 16,2^\circ, 18,8^\circ, 20,5^\circ, 20,8^\circ$ y $21,7^\circ$ en el espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal B del Compuesto (b) presenta un patrón como se muestra en la Figura 4 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

- 5 El cristal B del Compuesto (b) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 221°C según calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El cristal C del Compuesto (b) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,0^\circ, 10,5^\circ, 11,9^\circ, 15,2^\circ, 17,0^\circ, 20,9^\circ$ y $21,2^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal C del Compuesto (b) presenta un patrón como se muestra en la Figura 9 en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal C del Compuesto (b) también muestra un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 223°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

- 10 El cristal C del Compuesto (b) también muestra un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 223°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

El cristal C del Compuesto (b) presenta picos de absorción en números de onda de $1369\text{ cm}^{-1}, 1424\text{ cm}^{-1}, 1507\text{ cm}^{-1}, 1546\text{ cm}^{-1}$ y 1566 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo obtenido según el método KBrtable. El cristal C del Compuesto (b) también presenta un gráfico de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 15.

- 15 El cristal A del Compuesto (c) presenta picos característicos en ángulos de difracción $2\theta = 4,8^\circ, 7,6^\circ, 8,2^\circ, 9,7^\circ, 15,3^\circ, 16,6^\circ, 19,1^\circ, 19,8^\circ, 22,4^\circ$ y $26,2^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo. El cristal A del Compuesto (c) presenta un patrón como se muestra en la Figura 5 en un espectro de difracción de rayos X en polvo.

El cristal A del Compuesto (c) presenta un pico endotérmico con una temperatura de inicio extrapolada de 182°C según la calorimetría diferencial de barrido (CDB).

- 20 El cristal A del Compuesto (c) presenta picos de absorción en números de onda de $1115\text{ cm}^{-1}, 1446\text{ cm}^{-1}, 1508\text{ cm}^{-1}, 1560\text{ cm}^{-1}$ y 1601 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo obtenido según el método KBrtable. El cristal A del Compuesto (c) e también presenta un diagrama de espectro de absorción infrarrojo como se muestra en la Figura 16.

- 25 El cristal A del Compuesto (c) presenta desplazamientos químicos de 161,3 ppm, 150,8 ppm, 138,9 ppm, 128,1 ppm, 109,8 ppm, 82,7 ppm, 47,6 ppm, 42,5 ppm, 41,5 ppm, 24,5 ppm y 21,7 ppm en un Espectro de RMN C^{13} en estado sólido. El cristal A del Compuesto (c) también presenta un gráfico de espectro de RMN C^{13} en estado sólido como se muestra en la Figura 23-1 (6.500 Hz) y la Figura 23-2 (14.000 Hz).

El cristal A del Compuesto (c) presenta desplazamientos químicos a 242,8 ppm, 233,8 ppm, 219,0 ppm, 171,7 ppm, 86,9 ppm, 54,9 ppm, 11,3 ppm y -5,5 ppm en un espectro de RMN N^{15} en estado sólido. El cristal A del Compuesto (c) también presenta un Gráfico de espectro de RMN N^{15} en estado sólido como se muestra en la Figura 24.

- 30 El término "picos característicos" utilizado en el presente documento significa picos que se observan principalmente y son peculiares para cada uno de los polimorfos cristalinos en un espectro de difracción de rayos X en polvo. Los cristales identificados por los ángulos de difracción enumerados en la presente invención pueden exhibir otros picos además de los picos característicos.

- 35 La posición y la intensidad relativa de cada pico en un ángulo de difracción 2θ en un espectro de difracción de rayos X en polvo pueden variar un poco dependiendo de las condiciones de medición. En consecuencia, la identificación de los cristales debe determinarse en función de la similitud total de los patrones del espectro, aunque cada valor de 2θ difiere ligeramente. Los cristales dentro del alcance del margen de error están abarcados por la presente invención. Un margen de error de un valor de 2θ puede estar, por ejemplo, dentro de un intervalo de $\pm 0,5^\circ$ o $\pm 0,2^\circ$. Es decir, los cristales que tienen ángulos de difracción cada uno dentro del intervalo de $\pm 0,2^\circ$ a $\pm 0,5^\circ$ del valor respectivo mencionado anteriormente deben incluirse en el alcance del cristal según la presente invención.

- 40 Los cristales incluidos dentro del alcance de los errores resultantes de las condiciones para la espectrometría de difracción de rayos X en polvo (p. ej., instrumento de medición) también están abarcados por la presente invención.

- 45 El término "temperatura de inicio extrapolada" de un pico en el contexto de la calorimetría diferencial de barrido (CDB) significa la temperatura a la que comienza un pico exotérmico o endotérmico, es decir, una temperatura de inicio exotérmica o endotérmica calculada mediante extrapolación. Un pico exotérmico o endotérmico según la calorimetría diferencial de barrido (CDB) puede variar un poco dependiendo de las condiciones de medición. Un margen de error puede estar, por ejemplo, dentro de un intervalo de $\pm 5^\circ\text{C}$ o $\pm 2^\circ\text{C}$. Es decir, los cristales que tienen un pico dentro del intervalo de $\pm 2^\circ\text{C}$ a $\pm 5^\circ\text{C}$ del valor correspondiente mencionado anteriormente deben incluirse en el alcance del cristal según la presente invención.

- 50 En general, los desplazamientos químicos en un espectro de RMN sólido también pueden implicar errores. Un margen de error de un desplazamiento químico puede estar, por ejemplo, dentro de un intervalo de $\pm 0,25\text{ ppm}$, típicamente dentro de un intervalo de $\pm 0,5\text{ ppm}$. Es decir, los cristales que tienen desplazamientos químicos cada uno dentro del intervalo de $\pm 0,25\text{ ppm}$ a $\pm 0,5\text{ ppm}$ del valor respectivo mencionado anteriormente deben incluirse en el alcance del cristal según la presente invención. Las diferencias en, por ejemplo, las frecuencias de rotación y los instrumentos de

medición pueden afectar a la intensidad o a la aparición/desaparición de cada pico.

En general, los picos de absorción en un espectro de absorción infrarrojo también pueden implicar errores. Un margen de error de un pico de absorción puede estar, por ejemplo, dentro de un intervalo de $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$, típicamente dentro de un intervalo de $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$. A saber, cristales que tienen picos de absorción cada uno dentro del intervalo de $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ a $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ del valor respectivo mencionado anteriormente debe incluirse en el alcance del cristal según la presente invención.

Además, para cada una de las técnicas de espectrometría de difracción de rayos X en polvo, calorimetría diferencial de barrido (CDB), espectrometría de absorción infrarroja, espectrometría de RMN C^{13} en estado sólido y espectrometría de RMN N^{15} en estado sólido, aunque puede haber una diferencia entre un valor de medición real de un patrón de referencia para cada cristal (por ejemplo, un cristal obtenido por el método descrito en los ejemplos de la presente solicitud, los ejemplos de la presente memoria descriptiva) y el valor específico mencionado anteriormente, tal diferencia debe aceptarse como un error de medición. A saber, los cristales que tienen ángulos de difracción, picos endotérmicos o exotérmicos, espectros de absorción infrarrojos, espectros de RMN C^{13} en estado sólido, o espectros de RMN N^{15} en estado sólido que permanecen dentro del intervalo de error calculado de la manera mencionada anteriormente deben incluirse en el alcance del cristal según la presente invención.

Ejemplos

Los ejemplos de acuerdo con la invención se describirán ahora a modo de Ejemplos. Los métodos de síntesis, purificación y cristalización de los compuestos descritos en los siguientes ejemplos son meras realizaciones para la preparación del cristal de la presente invención y, por lo tanto, el cristal de la presente invención no debe limitarse al cristal preparado mediante los métodos de síntesis, purificación y cristalización del compuesto descrito en los siguientes ejemplos.

La estructura de los compuestos cristalinos de acuerdo con los Ejemplos y los nuevos compuestos aislados durante la síntesis se determinaron mediante $^1\text{H-NMR}$ o espectrometría de masas utilizando un LC/MS (cromatógrafo de líquidos/espectrómetro de masas).

La RMN- H^1 se midió con JEOL JNM-ECZ400S (400 MHz). La muestra patrón fue TMS (tetrametilsilano) (el pico a 0,0 ppm) para disolvente CDCl_3 , o sulfóxido de dimetilo (el pico a 2,49 ppm) para DMSO- d_6 . Con un espectro RMN H^1 (400 MHz, DMSO- d_6 , CD_3OD o CDCl_3), se muestran el desplazamiento químico (δ : ppm) y la constante de acoplamiento (J: Hz), donde s indica singlete, d indica doblete, t indica triplete, q indica cuartete, brs indica singlete amplio y m indica multiplete.

Los resultados de la espectrometría CL/EM están representados por $[\text{M}+\text{H}]^+$ (peso molecular observado (Obs. EM), es decir, protón $[\text{H}]^+$ se suma a la masa molecular $[\text{M}]$ del compuesto).

El espectro de difracción de rayos X de cada polvo cristalino de acuerdo con los Ejemplos se observó bajo las siguientes condiciones:

Instrumento: D8 DISCOVER Con GADDS CS fabricado por Bulker AXS Inc., fuente de rayos X: Cu-K α (longitud de onda: 1,541838 (10^{-10}m)), voltaje del tubo-corriente del tubo: 40kv-40mA, monocromador de grafito de placa plana del lado incidente, colimador: $\phi 300\mu\text{m}$, detector PSPC bidimensional, intervalo de exploración: 3 a 40°.

La calorimetría diferencial de barrido de las muestras en los Ejemplos se realizó bajo las siguientes condiciones:

Instrumento: CDB 8000 fabricado por Perkin Elmer, velocidad de calentamiento: 10°C/min, atmósfera: nitrógeno, platillo de muestra: aluminio, muestreo: 0,1 s, intervalo de exploración: de 25 a 300 °C.

El espectro de absorción IR (KBr) de cada muestra en los Ejemplos se observó de acuerdo con un procedimiento de pastilla de bromuro de potasio en la espectrometría de absorción IR descrita en los métodos generales de ensayo de la Farmacopea Japonesa bajo las siguientes condiciones:

Instrumento: AVATAR320 Nicolet iS5 fabricado por Thermo Fisher Scientific, intervalo de escaneo: 4000 a 400 cm^{-1} , resolución: 4 cm^{-1} , series de acumulación: 16. El espectro de RMN en estado sólido de cada muestra en los Ejemplos se observó bajo las siguientes condiciones:

Instrumento: Bruker DSX300WB, núcleos medidos: C^{13} y N^{15} , tiempo de repetición de pulso: 5 s, modo de pulso: CP/MAS.

[Ejemplo 1]

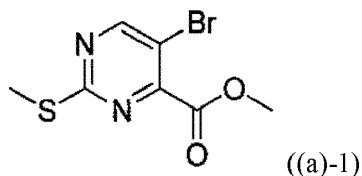
El ejemplo 1 describe el cristal D de 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridilo)piperazin-2-ona (Compuesto (a)).

Se describirá la síntesis del Compuesto (a).

<Síntesis del Compuesto (a)-1>

Se sintetizó 5-bromo-2-metiltiopirimidina-4-carboxilato de metilo (Compuesto (a)-1).

[Fórmula química 2]

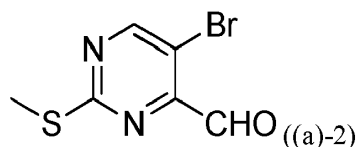


- 5 Una solución de ácido 5-bromo-2-(metiltio)pirimidina-4-carboxílico (110 g, 0,44 mol) en metanol (1,1 L) se enfrió a 0°C con agitación y luego se añadió gota a gota cloruro de tionilo (50 ml, 0,66 mol). La solución se calentó lentamente a reflujo durante cuatro horas. La finalización de la reacción se confirmó por CL/EM y CCF, la solución se enfrió a temperatura ambiente. El componente volátil se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo (1 litro). La solución se lavó con solución acuosa de carbonato de sodio al 10% (200 ml) tres veces y con salmuera saturada (200 ml) dos veces. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de separar por filtración el componente sólido, se concentró el filtrado. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (a)-1 (88 g, 75%).

<Síntesis del Compuesto (a)-2>

Se sintetizó el Compuesto (a)-2, 5-bromo-2-metiltiopirimidina-4-carbaldehído.

- 15 [Fórmula química 3]

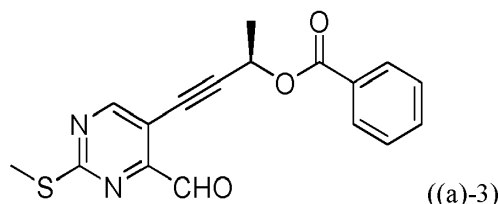


- 20 Una solución 1,7 M del Compuesto (a)-1 (25 g, 95 mmol) en THF (tetrahidrofurano) (375 mL) se enfrió con agitación a -78°C en una corriente de nitrógeno. A la solución se le añadió gota a gota hidruro de diisobutilaluminio (84 ml, 143 mmol) en tolueno y la mezcla se agitó durante cuatro horas a -78°C. Después de que se confirmara la finalización de la reacción por TLC, se añadió metanol gota a gota a -78°C para extinguir la reacción, y luego la solución se calentó lentamente a 0°C. La solución se diluyó con acetato de etilo y se filtró con succión a través de un lecho de Celite. El filtrado se lavó con salmuera saturada (200 ml) dos veces, la fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y luego se separó por filtración el componente sólido. El filtrado se concentró para dar el compuesto del título (25 g, compuesto bruto). El compuesto bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

<Síntesis del Compuesto (a)-3>

Se sintetizó el Compuesto (a)-3, benzoato de (R)-3-(4-formil-2-metiltiopirimidin-5-il)-1-metil-2-propinilo.

[Fórmula química 4]



- 30 Una solución de PdCl₂(PPh₃)₂Cl₂ (7.832 g, 11,2 mmol) y yoduro de cobre (2,12 g, 11,2 mmol) en 1,4-dioxano (60 ml) se desaireó y se purgó con argón. Se añadió diisopropiletilamina (25,29 ml, 145,1 mmol) a temperatura ambiente. La solución se agitó durante cinco minutos a temperatura ambiente y se añadió a temperatura ambiente una solución de una mezcla (26,0 g, compuesto bruto) del Compuesto (a)-2 y (5-bromo-2-metiltiopirimidin-4-il)metoximetanol en 1,4-dioxano (50 ml). A continuación, se añadió gradualmente gota a gota una solución de benzoato de (R)-1-
- 35

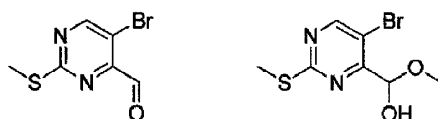
metilpropargilo (23,3 g, 133,9 mmol) en 1,4-dioxano (55 ml), y la solución se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se rastreó por CL/EM. Una vez completada la reacción, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (400 ml) y se filtró con succión a través de un lecho de Celite. El lecho de Celite se lavó con acetato de etilo. El filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto resultante se usó en la siguiente reacción sin purificación.

- 5 La síntesis de una mezcla del Compuesto (a)-2 y (5-bromo-2-metiltiopirimidin-4-il)metoximetanol se describirá en el Ejemplo de Referencia 1.

(Ejemplo de referencia 1)

Síntesis de la mezcla del Compuesto (a)-2 y (5-bromo-2-metiltiopirimidin-4-il)metoximetanol

[Fórmula química 5]

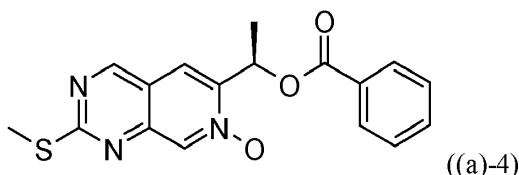


- 10 Una solución del Compuesto (a)-2 (25 g, 95 mmol) en THF (375 mL) se enfrió con agitación a -78°C en una corriente de nitrógeno. Se añadió gota a gota una solución 1,7 M de hidruro de diisobutilaluminio (84 ml, 143 mmol) en tolueno y la solución se agitó durante cuatro horas a -78°C . Después de confirmar la finalización de la reacción por CCF, se añadió metanol gota a gota a -78°C para extinguir la reacción. La solución se calentó lentamente a 0°C . La solución se diluyó con acetato de etilo y se filtró con succión a través de un lecho de Celite. El filtrado se lavó con salmuera saturada (200 ml) dos veces y la fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El componente sólido se separó por filtración. El filtrado se concentró dando la mezcla (25 g, compuesto bruto) del compuesto del título. El producto bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.
- 15

<Síntesis del Compuesto (a)-4>

- 20 Se sintetizó el Compuesto (a)-4, (R)-6-(1-(benzoiloxi)etil)-2-(metiltio)pirido[3,4-d]pirimidin-7-óxido.

[Fórmula química 6]



- 25 Se añadió sal monohidrocloreto de hidroxiamina (8,31 g, 119,6 mmol) y acetato de sodio (9,81 g, 119,6 mmol) a una solución (260 ml) del Compuesto (a)-3 (26,0 g, 79,8 mmol) en etanol a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó 16 horas a temperatura ambiente. Se añadió etanol (250 ml) a la solución, y se añadió carbonato de potasio (27,5 g, 199,4 mmol) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante tres horas a 50°C . La reacción se rastreó por CL/EM. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró con succión a través de un lecho de Celite. El lecho de Celite se lavó con acetato de etilo (1,0 L) y un pequeño volumen de metanol. El filtrado se concentró a presión reducida y la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El componente sólido se separó por filtración. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (a)-4 (13,0 g, 48%).
- 30

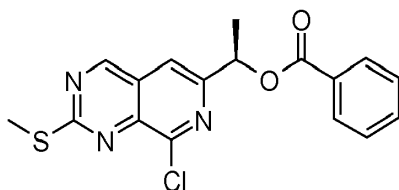
El espectro de RMN- ^1H del Compuesto (a)-4 es el siguiente:

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 9,04 (1H,s), 8,79 (1H,s), 8,14 (2H,d,J=7,5Hz), 7,77-7,40 (4H,m), 6,66 (1H,q,J=6,3Hz), 2,65 (3H, s), 1,79 (3H, d, J = 6,6 Hz)

- 35 <Síntesis del Compuesto (a)-5>

Se sintetizó el Compuesto (a)-5, benzoato de (R)-1-(8-cloro-2-(metiltio)pirido[3,4-d]pirimidin-6-il)etilo.

[Fórmula química 7]



((a)-5)

Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (51 ml, 704 mmol) a una solución (130 ml) del Compuesto (a)-4 (8,0 g, 23,5 mmol) en diclorometano a 0°C en una corriente de nitrógeno. La solución se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina (CCF). Una vez completada la reacción, la solución se concentró a presión reducida y la fase orgánica resultante se purificó mediante cromatografía en columna de alúmina para dar el Compuesto (a)-5 (3,2 g, 37%).

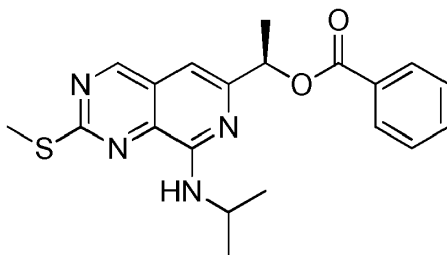
El espectro de RMN-H¹ del Compuesto (a)-5 es el siguiente:

RMN-H¹ (CDCl₃) δ: 9,19 (1H,s), 8,16-8,12 (2H,m), 7,68 (1H,s), 7,64-7,58 (1H,m), 7,53-7,46 (2H,m), 6,27 (1H,q, J=6,8 Hz), 2,74 (3H,s), 1,81 (3H,d,J=6,4Hz)

<Compuesto (a)-6>

Síntesis del Compuesto (a)-6, benzoato de (R)-1-(8-(isopropilamino)-2-(metiltio)pirido[3,4-d]pirimidin-6-il)etilo

[Fórmula química 8]



((a)-6)

Una mezcla del Compuesto (a)-5 (3,06 g, 8,5 mmol) e isopropilamina (18 ml) se agitó durante una hora a 80°C y luego la solución se enfrió a temperatura ambiente. La solución se diluyó con agua y se sometió a extracción con acetato de etilo. La fase orgánica resultante se lavó con salmuera y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidrido. Se separó el disolvente y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (a)-6 (1,78 g, rendimiento del 55%).

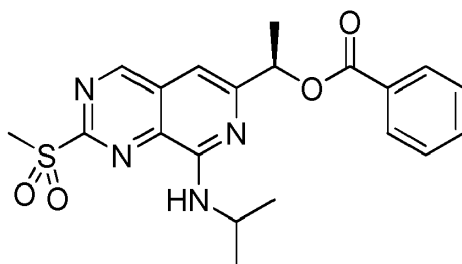
El espectro RMN-H¹ del Compuesto (a)-6 es el siguiente:

RMN-H¹ (DMSO-d₆) δ: 9,28 (1H,s), 8,08 (2H,d,J=7,4Hz), 7,70 (1H,t,J=7,4Hz), 7,57 (2H,t,J=7,7Hz), 7,05 (1H,d,J=8,0 Hz), 6,99 (1H,s), 5,34 (2H,s), 4,32 (1H,m), 2,66 (3H,s), 1,25 (6H,d,J=6,5 Hz)

<Síntesis del Compuesto (a)-7>

Se sintetizó el Compuesto (a)-7, benzoato de (R)-1-(8-(isopropilamino)-2-(metilsulfonil)pirido[3,4-d]pirimidin-6-il)etilo.

[Fórmula química 9]



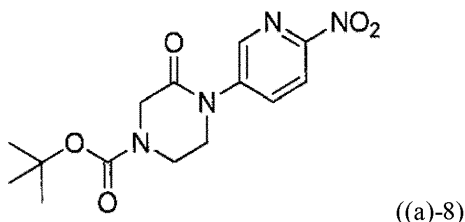
((a)-7)

Se añadió oxona (sulfato de peroximonopotasio) (5,72 g, 9,3 mmol) a una solución del Compuesto (a)-6 (1,78 g, 4,7 mmol) en una mezcla disolvente formada por tetrahidrofurano (47 ml) y agua (47 ml) a 0°C y la mezcla se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. La solución se sometió a extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se separó el disolvente y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (a)-7 (1,61 g, rendimiento del 87%). CL/EM: (M+H)⁺ = 415.0

<Síntesis del Compuesto (a)-8>

Se sintetizó el Compuesto (a)-8, 4-(6-nitropiridin-3-il)-3-oxopiperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 10]



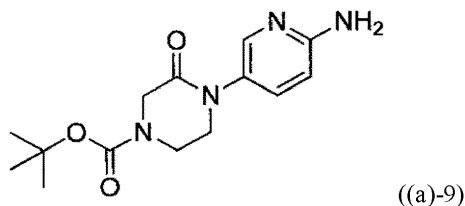
2-Nitro-5-bromopiridina (1,01, 5,0 mol), 2-oxo-4-piperazina-carboxilato de terc-butilo (1,00, 5,0 mol) y carbonato de cesio (3,26 g, 10,0 mmol) se suspendieron en 1,4-dioxano y se burbujeó gas nitrógeno en la suspensión durante 30 minutos. Se añadió a la suspensión xantfos (4,5'-bis(difenilfosfino)-9,9'-dimetilxanteno) (246 mg, 0,43 mmol) y tris(dibencilidenacetona)dipaladio (229 mg, 0,25 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo con agitación durante dos horas. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron agua y acetato de etilo. La solución se filtró a través de un lecho de Celite. La capa orgánica del filtrado se aisló y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas resultantes se combinaron y luego se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El componente sólido se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (a)-8 (1,08 g, 67%).

RMN-H¹ (CDCl₃) δ: 8,67 (1H,d,J=2,4Hz), 8,32 (1H,d,J=8,8Hz), 8,15 (1H,dd,J=8,8, 2,4Hz), 4,33 (2H,s), 3,93-3,83 (4H,m), 1,51 (9H,s)

<Síntesis del Compuesto (a)-9>

Se sintetizó el Compuesto (a)-9, 4-(6-aminopiridin-3-il)-3-oxopiperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 11]



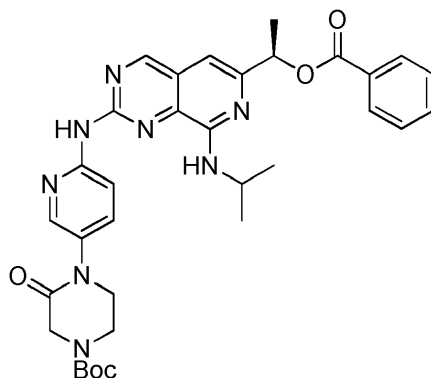
El Compuesto (a)-8 (1,08 g, 3,34 mmol) se disolvió en una mezcla de etanol (45 ml) y THF (22 ml). Se añadió paladio sobre carbono (108 mg) a la solución y la mezcla se agitó durante 24 horas en una atmósfera de hidrógeno. La solución se filtró a través de un lecho de Celite y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (a)-9 (0,928 g, 95%).

¹RMN-H (CDCl₃) δ: 7,99 (1H,d,J=2,4Hz), 7,38 (1H,dd,J=8,8, 2,4Hz), 6,53 (1H,d,J=8,8Hz), 4,50 (2H,brs), 4,24 (2H,s), 3,78 (2H,t,J=5,1 Hz), 3,67 (2H,t,J=5,4 Hz), 1,50 (9H,s)

<Síntesis del Compuesto (a)-10>

Se sintetizó el Compuesto (a)-10, (R)-4-(6-((1-(benzoiloxi)etil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-piridin-3-il)-3-oxopiperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 12]



((a)-10)

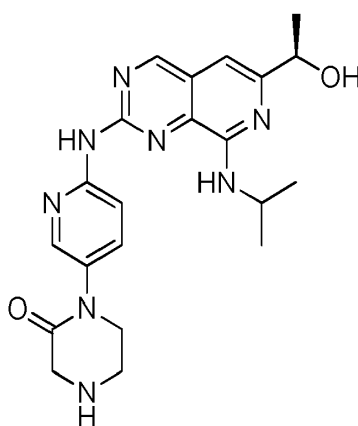
El Compuesto (a)-7 (62 mg, 0,15 mmol) y el Compuesto (a)-9 (88 mg, 0,30 mmol) se agitaron en tolueno (0,375 ml) a 100°C durante seis días. La solución se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el compuesto del título (a)-10 (0,0092 g, 10%).

¹RMN-H (DMSO) δ: 10,27 (1H,s), 9,27 (1H,s), 8,33 (2H,m), 8,07 (2H,m), 7,86 (1H,m), 7,70 (1H,m), 7,58 (3H,m), 7,00 (1H,s), 6,55 (1H,d), 5,98 (1H,q), 4,27 (1H,m), 4,11 (2H,s), 3,74 (4H,m), 1,68 (3H,d), 1,45 (9H,s), 1,30 (6H,m)

<Síntesis y purificación del Compuesto (a)>

Se sintetizó el Compuesto (a), 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazin-2-ona.

[Fórmula química 13]



(a)

Se añadió ácido fluoroacético (0,15 ml) a una solución del Compuesto (a)-10 (9,2 mg, 0,15 mmol) en diclorometano (0,35 ml) a temperatura ambiente y la solución se agitó durante una hora. Después de que la solución se evaporara a sequedad, se añadieron tetrahidrofurano (0,15 ml) y metanol (0,15 ml), y luego se añadió solución acuosa de hidróxido de litio 4 M (0,018 ml). La solución después de la reacción se neutralizó con ácido fórmico, el material resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el compuesto del título.

¹RMN-H (DMSO) δ: 10,16 (1H,s), 9,26 (1H,s), 8,31 (1H,m), 8,29 (1H,s), 7,81 (1H,m), 7,00 (1H,s), 6,42 (1H,m), 5,18 (1H,d), 4,63 (1H,m), 4,27 (1H,m), 3,65 (2H,m), 3,41 (2H,s), 3,05 (2H,m), 1,39 (3H,d), 1,30 (6H,m)

<Producción del cristal D del Compuesto (a)>

La solución del Compuesto (a) purificado por cromatografía en columna de gel de sílice se concentró hasta que precipitaron los cristales. De este modo se preparó el cristal D del Compuesto (a).

<Evaluación del cristal D del Compuesto (a)>

La Fig. 1 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 6,3°, 6,6°, 11,6°, 16,9° y 20,0° (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 277°C.

La Fig. 10 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 703 cm^{-1} , 896 cm^{-1} y 3418 cm^{-1} (número de onda).

Las Figs. 17-1 y 17-2 ilustran los espectros RMN- C^{13} en estado sólido del cristal. La figura 17-1 muestra el modo de 6.500 Hz y la figura 17-2 muestra el modo de 14.000 Hz . Se observaron picos a $136,0\text{ ppm}$, $111,2\text{ ppm}$, $105,1\text{ ppm}$, $101,8\text{ ppm}$, $52,7\text{ ppm}$, $49,6\text{ ppm}$, $42,9\text{ ppm}$, $23,8\text{ ppm}$ y $18,5\text{ ppm}$ (desplazamiento químico).

La Fig. 18 ilustra el espectro de RMN- N^{15} en estado sólido de los cristales. Se observaron picos a $248,6\text{ ppm}$, $245,7\text{ ppm}$, $229,2\text{ ppm}$, $214,5\text{ ppm}$, $174,3\text{ ppm}$, $86,5\text{ ppm}$, $54,7\text{ ppm}$ y $-12,4\text{ ppm}$ (desplazamiento químico).

[Ejemplo 2]

El ejemplo 2 explica el cristal A de 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazin-2-ona (Compuesto (a)).

<Producción del cristal A del Compuesto (a)>

El cristal A del Compuesto (a) se produjo por transformación del cristal D del Compuesto (a) preparado en el Ejemplo 1.

El cristal D se suspendió en 5 a 50 veces de etanol. La suspensión se calentó con agitación durante seis horas y luego se agitó a 0°C . El material precipitante se recogió por filtración y se secó dando cristales.

Aunque no hay límite en el volumen del disolvente, el tiempo de calentamiento, la condición de agitación, el tiempo de filtración, estos parámetros pueden afectar al rendimiento de los cristales, la pureza química, el diámetro de las partículas y la distribución del tamaño de las partículas. Se prefiere que estos parámetros se determinen apropiadamente. Los cristales se pueden recoger mediante cualquier proceso común, por ejemplo, filtración espontánea, filtración presurizada, filtración con succión, secado por calentamiento o secado por calentamiento a presión reducida.

<Evaluación del cristal A del Compuesto (a)>

La Fig. 2 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a $5,3^{\circ}$, $7,3^{\circ}$, $10,3^{\circ}$, $15,1^{\circ}$ y $17,4^{\circ}$ (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 277°C .

La Fig. 11 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 874 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} y 3314 cm^{-1} (número de onda).

Las Figs. 19-1 y 19-2 ilustran espectros RMN- C^{13} en estado sólido del cristal. La figura 19-1 muestra el modo de 6.500 Hz y la figura 19-2 muestra el modo de 14.000 Hz . Se observaron picos a $154,7\text{ ppm}$, $138,8\text{ ppm}$, $133,6\text{ ppm}$, $113,2\text{ ppm}$, $101,6\text{ ppm}$, $100,4\text{ ppm}$, $67,4\text{ ppm}$, $51,8\text{ ppm}$, $26,6\text{ ppm}$ y $23,3\text{ ppm}$ (desplazamiento químico).

La Fig. 20 ilustra el Espectro de RMN- N^{15} en estado sólido de los cristales. Se observaron picos a $243,6\text{ ppm}$, $86,7\text{ ppm}$, $56,7\text{ ppm}$ y $-12,4\text{ ppm}$ (desplazamiento químico).

[Ejemplo 3]

El ejemplo 3 explica el cristal B de 1-(6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazin-2-ona (Compuesto (a)).

<Producción del cristal B del Compuesto (a)>

El Compuesto (a) se purificó como en el Ejemplo 1 excepto que el disolvente utilizado en la cromatografía en columna fue diclorometano/metanol = 20/1, y la solución del Compuesto (a) se concentró hasta que precipitaron los cristales. De este modo se preparó el cristal B del Compuesto (a).

La Fig. 6 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a $5,3^{\circ}$, $6,0^{\circ}$, $6,7^{\circ}$, $10,4^{\circ}$ y $20,8^{\circ}$ (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 271°C .

[Ejemplo 4]

<Producción del cristal C del Compuesto (a)>

Se añadió dimetilsulfóxido ($5,4\text{ ml}$) a cristal D (900 mg) del Compuesto (a) y la mezcla se calentó a 70°C . La solución resultante se enfrió a 40°C . Se añadió acetonitrilo ($6,75\text{ ml}$), se enfrió a 15°C y luego se agitó durante dos horas. El componente sólido se recogió por filtración, se lavó con acetonitrilo ($2,5\text{ ml}$) y se secó a presión reducida a 40°C para dar el aducto del compuesto del título (986 mg , 92%) con dimetilsulfóxido.

<Evaluación del cristal C del Compuesto (a)>

La Fig. 7 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 6,0°, 10,0°, 13,7°, 20,3° y 23,0° (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 100°C y 278°C.

- 5 La Fig. 12 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 840 cm⁻¹, 904 cm⁻¹, 955 cm⁻¹, 1490 cm⁻¹ y 3281 cm⁻¹ (número de onda).

[Ejemplo 5]

<Producción del cristal I del Compuesto (a)>

- 10 Se añadió agua (10 ml) al cristal A (500 mg) del Compuesto (a), la mezcla se agitó durante cuatro días a temperatura ambiente. El sólido resultante se recogió por filtración y se secó a 30 °C bajo presión reducida para dar el compuesto del título (432 mg, 86 %).

<Evaluación del cristal I del Compuesto (a)>

La Fig. 8 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 5,2°, 7,2°, 9,5°, 14,5°, 16,5°, 20,9°, 25,0° y 27,9° (ángulo de difracción 2θ).

- 15 La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 272°C.

La Fig. 13 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 1081 cm⁻¹ y 1260 cm⁻¹ (número de onda).

[Ejemplo 6]

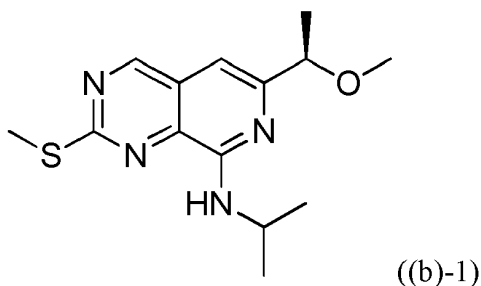
- 20 El ejemplo 6 explica el cristal A de 1-(6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazin-1-il(piperazina) (Compuesto (b)).

Ahora se describirá la síntesis del Compuesto (b).

<Síntesis del Compuesto (b)-1>

Se sintetizó el Compuesto (b)-1, (R)-N-isopropil-6-(1-metoxietil)-2-(metiltio)pirido[3,4-d]pirimidin-8-amina.

[Fórmula química 14]

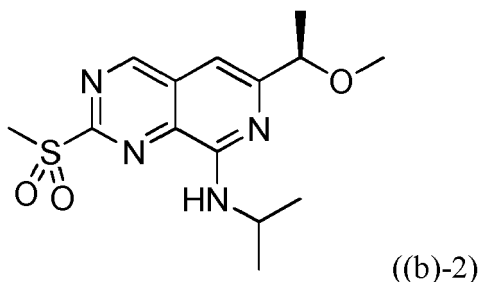


25 El Compuesto (b)-1 se sintetizó como se ha descrito para los Compuestos (a)-3, (a)-4, (a)-5 y (a)-6. RMN-H¹ (DMSO-d₆) δ: 9,27 (7H,s), 6,94 (1H,brs), 6,92 (1H,s), 4,30-4,23 (1H,m), 3,29 (3H,s), 2,66 (3H,s), 1,38 (3H,d,J=6,4Hz), 1,32-1,25 (6H,m)

<Síntesis del Compuesto (b)-2>

- 30 Se sintetizó el Compuesto (b)-2, (R)-N-isopropil-6-(1-metoxietil)-2-(metilsulfonil)pirido[3,4-d]pirimidin-8-amina.

[Fórmula química 15]



5 Se añadió oxona a una solución del Compuesto (b)-1 en una mezcla de tetrahidrofurano (THF) y agua a 0°C y se agitó durante 18 horas. El producto de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de separar el disolvente, el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (b)-2 del título.

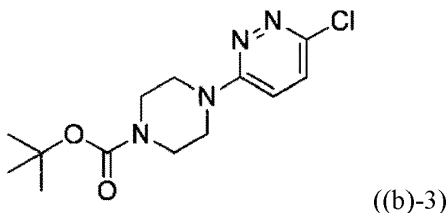
CL/EM: (M+H)⁺ = 325,10

<Síntesis del Compuesto (b)-3 >

Se sintetizó el Compuesto (b)-3, 4-(6-cloropiridazin-3-il) piperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

10

[Fórmula química 16]



15

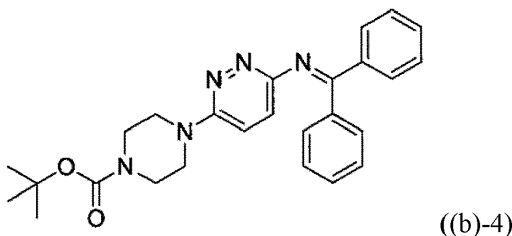
3,6-Dicloropiridazina (5,01 g, 33,6 mmol) y carboxilato de terc-butilpiperazina (6,88 g, 37,0 mmol) se disolvieron en DMF (50 ml). Se añadió trietilamina (11,7 ml, 50,4 mmol) y la mezcla se agitó a 80°C durante la noche. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua. El producto se extrajo tres veces con una mezcla de disolventes (50 ml) de diclorometano y metanol (95:5). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, y el componente sólido se recogió por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se lavó con éter dietílico para dar el Compuesto (b)-3 del título (7,0 g, 70%).

<Síntesis del Compuesto (b)-4>

Se sintetizó el Compuesto (b)-4, 4-(6-((difenilmetileno)amino)piridazin-3-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo.

20

[Fórmula química 17]



25

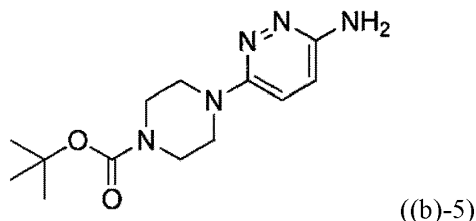
El Compuesto (b)-3 (59,8 mg, 0,20 mmol), benzofenona imina (43,5 mg, 0,24 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (9,2 mg, 0,010 mmol), BINAP (2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftilo) (12,5 mg, 0,020 mmol) y carbonato de cesio (130,3 mg, 0,40 mmol) se suspendieron en tolueno (1,0 ml) y la suspensión se agitó a 100°C durante la noche. Después de que la suspensión se enfriara a temperatura ambiente, la solución se filtró a través de un lecho de Celite y la capa de Celite se lavó con acetato de etilo. El filtrado resultante se lavó con salmuera saturada y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de separar por filtración el componente sólido, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto (b)-4 del título (67 mg, 76%).

<Síntesis del Compuesto (b)-5>

30

Se sintetizó el Compuesto (b)-5, 4-(6-aminopiridazin-3-il)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 18]



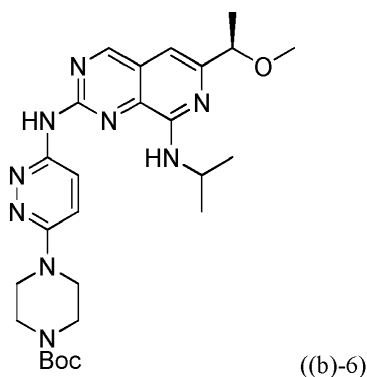
El Compuesto (b)-4 (67 mg, 0,151 mmol) se disolvió en THF (0,76 ml) y se añadió solución acuosa de ácido cítrico (0,378 ml, 0,755 mmol, 2 mol/L). La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sistema de reacción se neutralizó con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (5 ml) y el producto se extrajo dos veces con acetato de etilo (5 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de separar por filtración los componentes sólidos, el filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se lavó con terc-butil metil éter (5 ml) para dar el Compuesto (b)-5 del título (0,30 g, 71%).

La síntesis de compuestos relacionados con los ejemplos de la invención, es decir, 6-aminopiridina-3-carbaldehído y 4-[(6-aminopiridin-3-il)metil]piperazina-1-carboxilato de terc-butilo se describirá ahora en los siguientes ejemplos de referencia.

<Síntesis del Compuesto (b)-6>

Se sintetizó Compuesto (b)-6, (R)-4-((8-((isopropilamino)-6-(1-metoxietil)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)piridazin-3-il)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 19]

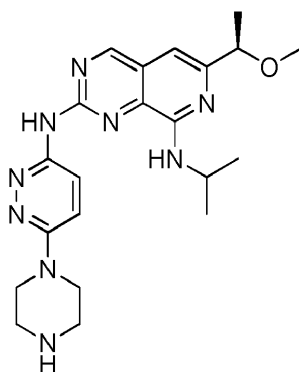


Una solución del Compuesto (a)-5 (708 mg, 2,2 mmol) y el Compuesto (b)-5 (732 mg, 2,6 mmol) sintetizados en el Ejemplo 1 en tolueno (5,5 ml) se agitó durante tres días a 100°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución se diluyó con acetato de etilo (20 ml) y diclorometano (100 ml). La solución se lavó con salmuera saturada (90 ml) y luego con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (10 ml). La fase orgánica aislada se evaporó a sequedad y se purificó a través de una columna de gel de sílice para dar el Compuesto (b)-6 del título (510 mg, 45%).

<Síntesis del Compuesto (b)>

Se sintetizó el Compuesto (b), 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazin-1-il(piperazina).

[Fórmula química 20]



(b)

Se añadió ácido trifluoroacético (0,2 ml) a una solución del Compuesto (b)-6 (33,2 mg, 0,063 mmol) en diclorometano (0,44 ml) a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. La solución se concentró a sequedad y el producto se purificó mediante HPLC preparativa para dar el compuesto del título (23,8 mg, 88%).

RMN- ^1H (DMSO) δ : 10,24 (1H,s), 9,20 (1H,s), 8,16 (1H,d), 7,36 (1H,d), 6,86 (1H,s), 6,35 (1H,d), 6,42 (1H,m), 4,22 (2H,m), 3,43 (4H,m), 3,26 (4H,m), 2,81 (3H,m), 1,37 (3H,d), 1,26 (6H,m)

<Producción del cristal A del Compuesto (b)>

Se preparó la sal de ácido trifluoroacético (TFA) del Compuesto (b) purificado por HPLC preparativa. La sal de TFA se agitó en una mezcla de agua y diclorometano. El pH de la fase acuosa se ajustó a alcalino débil (pH 8 a 9) con solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y la fase orgánica se aisló. Después de lavar la fase orgánica con salmuera saturada y secar sobre sulfato de sodio anhidro, se separó el disolvente para dar el cristal A.

<Evaluación del cristal A del Compuesto (b)>

La Fig. 3 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 5,2°, 7,6°, 8,4°, 10,5°, 15,2°, 16,9°, 20,1°, 21,0°, 23,3° y 26,6° (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 225°C.

La Fig. 14 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} (número de onda).

Las Figs. 21-1 y 21-2 ilustran espectros RMN- ^{13}C en estado sólido del cristal. La figura 21-1 muestra el modo de 6.500 Hz y la figura 21-2 muestra el modo de 14.000 Hz. Se observaron picos a 163,4 ppm, 157,6 ppm, 155,5 ppm, 117,8 ppm, 82,2 ppm, 56,1 ppm y 42,3 ppm (desplazamiento químico).

La Fig. 22 ilustra el espectro de RMN- ^{15}N en estado sólido de los cristales. Se observaron picos a 311,7 ppm, 232,4 ppm, 168,5 ppm, 79,5 ppm, 53,3 ppm, 32,9 ppm y -4,3 ppm (desplazamiento químico).

[Ejemplos 7]

El ejemplo 7 explica el cristal B de 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazin-1-il(piperazina) (Compuesto (b)).

<Producción del cristal B del Compuesto (b)>

Se añadieron tetrahidrofurano (0,15 ml) y metanol (0,15 ml) a la sal de TFA precipitada durante la producción de Crystal A, y luego se añadió solución acuosa de hidróxido de litio 4 M (0,018 ml). La solución se neutralizó con ácido fórmico y el producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. La solución del Compuesto (b) se concentró hasta que precipitaron los cristales. De este modo se preparó el cristal B del Compuesto (b).

<Evaluación del cristal B del Compuesto (b)>

La Fig. 4 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 5,2°, 6,6°, 8,1°, 15,2°, 15,9°, 16,2°, 18,8°, 20,5°, 20,8° y 21,7° (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 221°C.

[Ejemplo 8]

<Producción del cristal C del Compuesto (b)>

Se añadió etanol (11 ml) a cristal C (1,1 g) del Compuesto (b) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El componente sólido resultante se recogió por filtración y se secó a 40°C bajo presión reducida para dar el compuesto del título (945 mg, 86%).

<Evaluación del cristal C del Compuesto (b)>

La Fig. 9 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 5,2°, 7,6°, 8,4°, 10,0°, 10,5°, 11,9°, 15,2°, 17,0°, 20,9° y 21,2° (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 223°C.

La Fig. 15 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 1369 cm⁻¹, 1424 cm⁻¹, 1507 cm⁻¹, 1546 cm⁻¹ y 1566 cm⁻¹ (número de onda).

[Ejemplo 9]

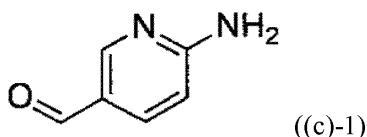
El ejemplo 9 explica el cristal A de (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazin-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidin-2,8-diamina (Compuesto (c)).

Ahora se describirá la síntesis del Compuesto (c).

<Síntesis del Compuesto (c)-1>

Se sintetizó el Compuesto (c) 1,6-aminopiridina-3-carbaldehído.

[Fórmula química 21]

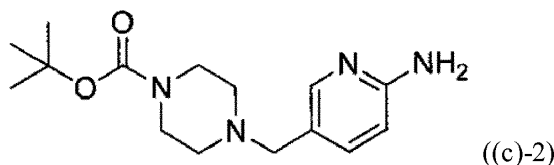


6-Aminopiridin-3-carbonitrilo (1,9 g, 16 mmol) se disolvió en THF (160 ml) y la solución se enfrió con agitación a -78°C. Se añadió gradualmente gota a gota hidruro de diisobutilaluminio (106,5 ml, solución de tolueno 1,5 M) a la solución a -78 °C, se calentó con agitación a 20°C y se agitó adicionalmente durante dos horas. Se añadió agua helada (100 ml) a la solución para extinguir la reacción. El producto se extrajo tres veces con diclorometano (50 ml). Después de combinar las fases orgánicas resultantes, la solución se lavó con salmuera (100 ml) una vez y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de separar por filtración el componente sólido, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para dar el Compuesto (c)-1 del título bruto (1,7 g). El producto bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

<Síntesis del Compuesto (c)-2>

Se sintetizó el Compuesto (c)-2, 4-[(6-aminopiridin-3-il)metil]piperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 22]



6-Aminopiridin-3-carbonitrilo (1,9 g, 16 mmol) se disolvió en THF (160 ml) y la mezcla se enfrió con agitación a -78°C. Se añadió gradualmente gota a gota hidruro de diisobutilaluminio (106,5 ml, solución de tolueno 1,5 M) a la solución a -78°C. El sistema se calentó con agitación a 20°C y se agitó adicionalmente durante dos horas. Se añadió agua helada (100 ml) a la solución para extinguir la reacción. El producto se extrajo tres veces con diclorometano (50 ml). Después de combinar las fases orgánicas, la solución se lavó con salmuera (100 ml) una vez y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de separar por filtración el componente sólido, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice para dar el compuesto del título bruto (1,7 g).

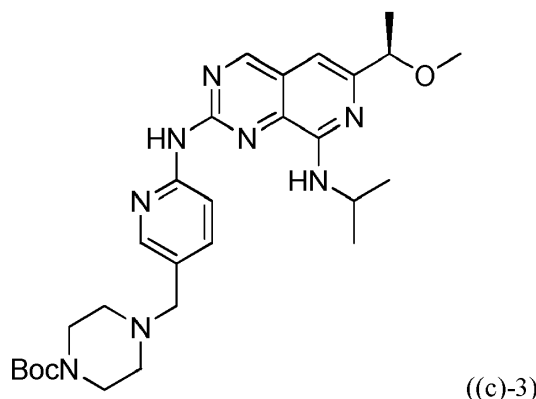
El producto bruto resultante (1,7 g, 13,9 mmol) y piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (3,2 g, 17,2 mmol) se disolvieron en diclorometano (50 ml) y la mezcla se agitó durante ocho horas a temperatura ambiente. Se añadió

triacetoxiborohidruro de sodio (8,84 g, 40,9 mmol) a la solución y la mezcla se agitó durante dos horas a temperatura ambiente. La reacción se rastreó por CL/EM. Una vez completada la reacción, se añadió solución acuosa saturada de carbonato de sodio (50 ml) para extinguir la reacción. El producto se extrajo tres veces con acetato de etilo (50 ml). Después de combinar las fases orgánicas resultantes, la solución se lavó con salmuera (100 ml) una vez y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de separar por filtración el componente sólido, el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para dar el compuesto del título bruto (3,8 g, 81%).

<Síntesis del Compuesto (c)-3>

Se sintetizó el Compuesto (c)-3, (R)-4-((6-((8-(isopropilamino)-6-(1-metoxietil)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)piridin-3-il)metil)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

[Fórmula química 23]

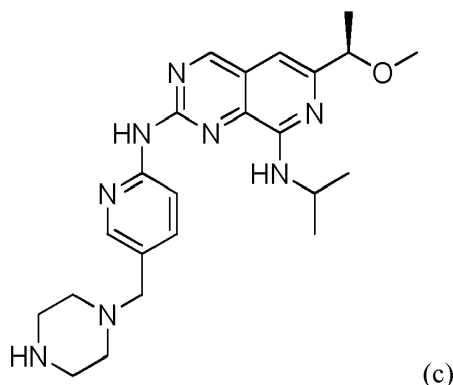


El Compuesto (c)-3 del título se sintetizó como se ha descrito para el Compuesto (b)-6 usando los Compuestos B-2 y C-2.

<Síntesis del Compuesto (c)>

Síntesis del Compuesto (c), (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazin-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]-pirimidina-2,8-diamina

[Fórmula química 24]



El compuesto del título se preparó con el Compuesto (c)-3 como se ha descrito para el Compuesto (a) en el Ejemplo 1.

¹RMN-H (CDCl₃) δ : 9,04(1H,s), 8,34(1H,d), 8,26(1H,s), 7,74(1H,dd), 6,84(1H,s), 6,14(1H,d), 4,41(1H,m), 4,33(1H,q), 3,49(2H,s), 3,41(3H,s), 2,91(4H,m), 2,46(4H,br), 1,50(3H,d), 1,36(6H,m)

<Producción del cristal A del Compuesto (c)>

La solución del Compuesto (c) purificada por HPLC preparativa se concentró hasta que precipitaron los cristales. De este modo se preparó el cristal A del Compuesto (c).

<Evaluación del cristal A del Compuesto (c)>

La Fig. 5 ilustra el espectro de difracción de rayos X del cristal resultante. Se observaron picos a 4,8°, 7,6°, 8,2°, 9,7°, 15,3°, 16,6°, 19,1°, 19,8°, 22,4° y 26,2° (ángulo de difracción 2θ).

La curva de flujo de calor por calorimetría diferencial de barrido (CDB) tuvo un pico endotérmico a 182°C.

La Fig. 16 ilustra el espectro de absorción IR (KBr) del cristal. Se observaron picos de absorción a 1115 cm⁻¹, 1446 cm⁻¹, 1508 cm⁻¹, 1560 cm⁻¹ y 1601 cm⁻¹ (número de onda).

5 Figs. 23-1 y 23-2 ilustran espectros RMN-C¹³ en estado sólido del cristal. La figura 23-1 muestra el modo de 6.500 Hz y la figura 23-2 muestra el modo de 14.000 Hz. Se observaron picos a 161,3 ppm, 150,8 ppm, 138,9 ppm, 128,1 ppm, 109,8 ppm, 82,7 ppm, 47,6 ppm, 42,5 ppm, 41,5 ppm, 24,5 ppm y 21,7 ppm (desplazamiento químico).

La Fig. 24 ilustra el espectro de RMN-N¹⁵ en estado sólido de los cristales. Se observaron picos a 242,8 ppm, 233,8 ppm, 219,0 ppm, 171,7 ppm, 86,9 ppm, 54,9 ppm, 11,3 ppm y -5,5 ppm (desplazamiento químico).

[Ejemplo 10]

10 Evaluación de la actividad inhibidora contra el complejo CDK4/ciclina D3 humano

Se evaluaron las actividades inhibidoras de los Compuestos (a), (b) y (c) contra el complejo CDK4/ciclina D3 humano.

15 La actividad inhibidora contra el complejo CDK4/ciclina D3 humano de cada compuesto se determinó con un kit de ensayo (kit QS S Assist CDK4/Cyclin D3_FP) disponible a partir de Carna Biosciences, Inc. Este kit de ensayo puede determinar la actividad de la quinasa mediante la determinación de una variación en la polarización de fluorescencia provocada por la unión de un sustrato fluorescente fosforilado por quinasa a un reactivo de unión de IMAP basado en la tecnología IMAP de Molecular Devices.

20 Para preparar las soluciones de muestra, se utilizó un tampón de ensayo (10x) incluido en el kit o un tampón de ensayo fabricado en laboratorio que tenía la misma composición que el del kit. El tampón de ensayo (10x) contenido en el kit se diluyó diez veces con agua purificada para preparar un tampón de ensayo. El tampón de ensayo contenía HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 al 0,01 % y ditiotreitól 2 mM. El compuesto de ensayo se preparó con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 100 veces mayor que la concentración final y luego se diluyó con el tampón de ensayo hasta 25 veces, de modo que la concentración de la solución del compuesto de ensayo fue cuatro veces la concentración final. La solución de ATP(5x)/sustrato/metal contenida en el kit se diluyó cinco veces con el tampón de ensayo antes de su uso. El complejo CDK4/ciclina D3 contenido en el kit se diluyó con el tampón de ensayo a una concentración dos veces mayor que la concentración final para preparar una solución enzimática (la concentración final de CDK4/ciclina D3 fue de 12,5 a 25 ng/pocillo). El tampón de unión A de IMAP (5x) y el tampón de unión B de IMAP (5x) se diluyeron cada uno con agua purificada hasta cinco veces, estos tampones se mezclaron de tal manera que la relación entre el tampón de unión A de IMAP y el tampón de unión B de IMAP fue de 85:15, y se añadió el reactivo de unión de IMAP hasta una dilución de 400 veces para preparar un reactivo de detección.

30 La solución del compuesto de ensayo (5 µL) y la solución de ATP/sustrato/metal (5 µL) se colocaron en una placa de 384 pocillos. Después de colocar la solución enzimática o el tampón de ensayo (10 µL), la solución se mezcló para iniciar la reacción enzimática. El volumen total de la solución fue de 20 µL/pocillo, y la solución de reacción contenía HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 al 0,01 %, ditiotreitól 2 mM, sustrato peptídico marcado con FITC 100 nM (Carna Biosciences, Inc.), ATP 100 µM, cloruro de magnesio 1 mM, DMSO al 1% y 12,5 a 25 ng/pocillo de CDK4/ciclina D3. Después de la reacción durante 45 minutos a temperatura ambiente, se añadió el reactivo de detección (60 µL) a cada pocillo, y se dejó continuar la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de protección contra la luz. La polarización de la fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de detección de 535 nm con un lector de microplacas.

40 Se añadió la solución enzimática y se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática del compuesto de ensayo, donde la actividad enzimática cuando se añadió DMSO en lugar de la solución del compuesto de ensayo se definió como 100% y la actividad enzimática cuando se añadió el tampón de ensayo en lugar de la solución enzimática y se añadió DMSO en lugar de la solución del compuesto de ensayo, se definió como 0%. El porcentaje de inhibición se ajustó a una curva de dosis-respuesta para calcular la concentración inhibidora del 50% frente a CDK4/ciclina D3.

45 La actividad inhibidora CI₅₀ de cada compuesto frente a la actividad de CDK4/ciclina D3 fue inferior a 10 nM.

[Ejemplo 11]

Evaluación de la actividad inhibidora del complejo CDK2/ciclina A2 humano

50 Los compuestos A, B y C se sometieron a una evaluación de la actividad inhibidora contra el complejo CDK2/ciclina A2 humano usando un kit de ensayo (kit QS S Assist CDK2/Cyclin A2_FP) disponible a partir de Carna Biosciences, Inc. Este kit de ensayo puede determinar la actividad de quinasa mediante la determinación de una variación en la polarización de la fluorescencia provocada por la unión de un sustrato fluorescente fosforilado por quinasa a un reactivo de unión de IMAP basado en la tecnología IMAP de Molecular Devices.

El tampón de ensayo (10x) contenido en el kit se diluyó diez veces con agua purificada para preparar un tampón de ensayo, que luego se usó para la preparación de cada solución. El tampón de ensayo contenía HEPES 20 mM (pH

7,4), Tween 20 al 0,01% y ditiotreitól 2 mM. Cada compuesto de ensayo se diluyó con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 100 veces mayor que la concentración final y luego se diluyó con el tampón de ensayo a 25 veces, de modo que la concentración del compuesto de ensayo fuera cuatro veces la concentración final, para preparar una solución del compuesto de ensayo. La solución de ATP(5x)/sustrato/metal contenida en el kit se diluyó cinco veces con el tampón de ensayo antes de su uso. El complejo CDK2/ciclina A2 contenido en el kit se diluyó con el tampón de ensayo en una concentración dos veces mayor que la concentración final para preparar una solución enzimática (la concentración final de CDK2/ciclina A2 fue de 2,5 ng/pocillo). El tampón de unión A de IMAP (5x) se diluyó con agua purificada hasta cinco veces y el reactivo de unión de IMAP se añadió a una dilución de 400 veces para preparar un reactivo de detección.

La solución del compuesto de ensayo (5 µL) y la solución de ATP/sustrato/metal (5 µL) se colocaron en una placa de 384 pocillos. Después de colocar la solución enzimática o el tampón de ensayo (10 µL), la solución se mezcló para iniciar la reacción enzimática. El volumen total de la solución fue de 20 µL/pocillo, y la solución de reacción contenía HEPES 20 mM (pH 7,4), Tween 20 al 0,01%, ditiotreitól 2 mM, sustrato peptídico marcado con FITC 100 nM (Carna Biosciences, Inc.), ATP 30 µM, cloruro de magnesio 5 mM, DMSO al 1% y 2,5 ng/pocillo de CDK2/ciclina A2. Después de la reacción durante 60 minutos a temperatura ambiente, se añadió el reactivo de detección (60 µL) a cada pocillo, y se dejó continuar la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de protección contra la luz. La polarización de la fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de detección de 535 nm con un lector de microplacas.

Se añadió la solución enzimática y se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática del compuesto de ensayo, donde la actividad enzimática cuando se añadió DMSO en lugar de la solución del compuesto de ensayo se definió como 100% y la actividad enzimática cuando se añadió el tampón de ensayo en lugar de la solución enzimática y se añadió DMSO en lugar de la solución del compuesto de ensayo se definió como 0%. El porcentaje de inhibición se ajustó a una curva de dosis-respuesta para calcular la concentración inhibidora del 50% frente a CDK2/ciclina A2.

La actividad inhibidora CI_{50} de cada compuesto frente a la actividad de CDK4/ciclina D3 fue igual o inferior a 100 nM.

[Ejemplo 12]

Evaluación de la actividad inhibidora frente al complejo CDK6/ciclina D3 humano

La actividad inhibidora de CDK6/ciclina D3 se determinó mediante el ensayo de cambio de movilidad fuera del chip (MSA). El MSA puede determinar la actividad quinasa que implica la separación de proteínas mediante una diferencia de movilidad durante la electroforesis en función del peso molecular y la carga eléctrica de cada proteína. La actividad quinasa se determinó mediante separación electroforética de proteínas que tenían diferentes electronegatividades dependiendo de la proporción de fosforilación por parte de la quinasa.

Cada solución se preparó con un tampón de ensayo que contenía HEPES 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 al 0,01 % y ditiotreitól 2 mM. Cada compuesto de ensayo se diluyó con dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración 100 veces mayor que la concentración final y luego se diluyó con el tampón de ensayo a 25 veces, de modo que la concentración del compuesto de ensayo fuera cuatro veces la concentración final, para preparar una solución del compuesto de ensayo. La solución de ATP/sustrato/metal se preparó de manera que la concentración fuera cuatro veces la concentración final. La solución de enzima se preparó de manera que la concentración fuera dos veces la concentración final. La concentración final de la enzima se ajustó adecuadamente en función de la señal de la actividad de la enzima y la actividad inhibidora del compuesto de control positivo.

La solución del compuesto de ensayo (5 µL) y la solución de ATP/sustrato/metal (5 µL) se colocaron en una placa de 384 pocillos. Después de colocar la solución enzimática o el tampón de ensayo (10 µL), la solución se mezcló para iniciar la reacción enzimática. El volumen total de la solución fue de 20 µL/pocillo, y la solución de reacción contenía HEPES 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 al 0,01%, ditiotreitól 2 mM, sustrato peptídico 1000 nM (DYRKtide-F), ATP 300 µM, cloruro de magnesio 5 mM, DMSO al 1% y CDK6/ciclina D3 con una concentración diseñada. Después de la reacción durante cinco horas a temperatura ambiente, se añadió un tampón de terminación (QuickScout Screening Assist MSA; Carna Biosciences, Inc.) (60 µL) a cada pocillo para extinguir la reacción. El péptido sustrato y el péptido fosforilado en la solución se separaron y determinaron con LabChip 3000 (Caliper Lifesciences). La reactividad de la quinasa se evaluó mediante la relación de producto (P/(P+S) de la altura del pico (S) del péptido sustrato a la altura del pico (P) del péptido fosforilado.

Se añadió la solución enzimática y se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática del compuesto de ensayo, donde la actividad enzimática cuando se añadió DMSO en lugar de la solución del compuesto de ensayo se definió como 100% y la actividad enzimática cuando se añadió el tampón de ensayo en lugar de la solución enzimática y se añadió DMSO en lugar de la solución del compuesto de ensayo, se definió como 0%. El porcentaje de inhibición se ajustó a una curva de dosis-respuesta para calcular la concentración inhibidora del 50% frente a CDK6/ciclina D3.

La actividad inhibidora CI_{50} de cada compuesto frente a la actividad de CDK6/ciclina D3 fue inferior a 10 nM.

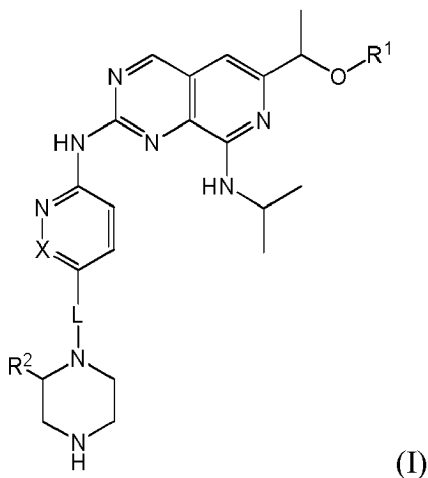
Aplicabilidad industrial

El cristal del compuesto de fórmula (I), en donde el compuesto representado por la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:

- 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona;
- 5 1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina; y
- (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazina-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina,
- se puede utilizar como ingrediente activo para la fabricación de un producto farmacéutico.

REIVINDICACIONES

1. Un cristal de un compuesto representado por la fórmula (I):



donde R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃, R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo oxo, L representa un enlace simple o un grupo alquileo C₁₋₃, y X representa CH o N;

o un solvato del mismo,

donde el compuesto representado por la fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:

1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona;

1-(6-((6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina; y

(R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazin-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina.

2. El cristal según la reivindicación 1, en donde el compuesto es 1-(6-((6-((1R)-1-hidroxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridil)piperazina-2-ona.

3. El cristal de acuerdo con la reivindicación 2, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 6,3^\circ, 6,6^\circ, 11,6^\circ, 16,9^\circ$ y $20,0^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta uno o más de los siguientes (i) a (iv):

(i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 277°C según calorimetría diferencial de barrido;

(ii) picos de absorción característicos con números de onda de 703 cm^{-1} , 896 cm^{-1} y 3418 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr;

(iii) picos característicos a $136,0\text{ ppm}$, $111,2\text{ ppm}$, $105,1\text{ ppm}$, $101,8\text{ ppm}$, $52,7\text{ ppm}$, $49,6\text{ ppm}$, $42,9\text{ ppm}$, $23,8\text{ ppm}$ y $18,5\text{ ppm}$ en un espectro de RMN de C^{13} en estado sólido;

(iv) picos característicos a $248,6\text{ ppm}$, $245,7\text{ ppm}$, $229,2\text{ ppm}$, $214,5\text{ ppm}$, $174,3\text{ ppm}$, $86,5\text{ ppm}$, $54,7\text{ ppm}$ y $-12,4\text{ ppm}$ en un espectro de RMN de N^{15} en estado sólido.

4. El cristal según la reivindicación 2, que muestra picos en ángulos de difracción $2\theta = 5,3^\circ, 7,3^\circ, 10,3^\circ, 15,1^\circ$ y $17,4^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta uno o más de los siguientes (i) a (iv):

(i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 277°C según calorimetría diferencial de barrido;

(ii) picos de absorción característicos con números de onda de 874 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} y 3314 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr;

(iii) picos característicos a $154,7\text{ ppm}$, $138,8\text{ ppm}$, $133,6\text{ ppm}$, $113,2\text{ ppm}$, $101,6\text{ ppm}$, $100,4\text{ ppm}$, $67,4\text{ ppm}$, $51,8\text{ ppm}$, $26,6\text{ ppm}$ y $23,3\text{ ppm}$ en un espectro de RMN de C^{13} en estado sólido;

(iv) picos característicos a $243,6\text{ ppm}$, $86,7\text{ ppm}$, $56,7\text{ ppm}$ y $-12,4\text{ ppm}$ en un espectro de RMN de N^{15} en estado sólido.

5. El cristal según la reivindicación 2, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 5,3^\circ, 6,0^\circ, 6,7^\circ, 10,4^\circ$ y $20,8^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta además una temperatura de inicio

extrapolada para un pico endotérmico de 271°C según calorimetría diferencial de barrido.

6. El cristal según la reivindicación 2, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 6,0^\circ, 10,0^\circ, 13,7^\circ, 20,3^\circ$ y $23,0^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo y, preferentemente, presenta además uno o más de los siguientes (i) y (ii):

- 5 (i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 100°C y 278°C según calorimetría diferencial de barrido;
- (ii) picos de absorción característicos con números de onda de 840 cm^{-1} , 904 cm^{-1} , 955 cm^{-1} , 1490 cm^{-1} y 3281 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr.

10 7. El cristal según la reivindicación 2, que muestra picos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 7,2^\circ, 9,5^\circ, 14,5^\circ, 16,5^\circ, 20,9^\circ, 25,0^\circ$ y $27,9^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta además uno o más de los siguientes (i) y (ii):

- (i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 272°C según calorimetría diferencial de barrido;
- 15 (ii) picos de absorción característicos con números de onda de 1081 cm^{-1} y 1260 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr.

8. El cristal según la reivindicación 1, en el que el compuesto es 1-(6-((1R)-1-metoxietil)-8-(isopropilamino)pirido[3,4-d]pirimidin-2-il)amino)-3-piridazil)piperazina.

20 9. El cristal según la reivindicación 8, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,5^\circ, 15,2^\circ, 16,9^\circ, 20,1^\circ, 21,0^\circ, 23,3^\circ$ y $26,6^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta además uno o más de los siguientes (i) a (iv):

- (i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 225°C según calorimetría diferencial de barrido;
- (ii) picos de absorción característicos con números de onda de 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr;
- 25 (iii) picos característicos a 163,4 ppm, 157,6 ppm, 155,5 ppm, 117,8 ppm, 82,2 ppm, 56,1 ppm y 42,3 ppm en un espectro de RMN de C^{13} en estado sólido;
- (iv) picos característicos a 311,7 ppm, 232,4 ppm, 168,5 ppm, 79,5 ppm, 53,3 ppm, 32,9 ppm y -4,3 ppm en un espectro de RMN de N^{15} en estado sólido.

30 10. El cristal según la reivindicación 8, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 6,6^\circ, 8,1^\circ, 15,2^\circ, 15,9^\circ, 16,2^\circ, 18,8^\circ, 20,5^\circ, 20,8^\circ$ y $21,7^\circ$, en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta además una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 221°C según calorimetría diferencial de barrido.

11. El cristal según la reivindicación 8, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 5,2^\circ, 7,6^\circ, 8,4^\circ, 10,0^\circ, 10,5^\circ, 11,9^\circ, 15,2^\circ, 17,0^\circ, 20,9^\circ$ y $21,2^\circ$, en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y preferiblemente presenta además uno o más de los siguientes (i) y (ii):

- (i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 223°C según calorimetría diferencial de barrido;
- 35 (ii) picos de absorción característicos con números de onda de 1369 cm^{-1} , 1424 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1546 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr.

12. El cristal según la reivindicación 1, en donde el compuesto es (R)-N8-isopropil-6-(1-metoxietil)-N2-(5-(piperazin-1-ilmetil)piridin-2-il)pirido[3,4-d]pirimidina-2,8-diamina.

40 13. El cristal según la reivindicación 12, que presenta picos en ángulos de difracción $2\theta = 4,8^\circ, 7,6^\circ, 8,2^\circ, 9,7^\circ, 15,3^\circ, 16,6^\circ, 19,1^\circ, 19,8^\circ, 22,4^\circ$ y $26,2^\circ$ en un espectro de difracción de rayos X en polvo, y que preferiblemente presenta uno o más de los siguientes (i) a (iv):

- (i) una temperatura de inicio extrapolada para un pico endotérmico de 182°C según calorimetría diferencial de barrido;
- (ii) picos de absorción característicos con números de onda de 1115 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} y 1601 cm^{-1} en un espectro de absorción infrarrojo utilizando el método KBr;
- 45 (iii) picos característicos a 161,3 ppm, 150,8 ppm, 138,9 ppm, 128,1 ppm, 109,8 ppm, 82,7 ppm, 47,6 ppm, 42,5 ppm, 41,5 ppm, 24,5 ppm y 21,7 ppm en un sólido espectro de RMN de C^{13} en estado sólido;
- (iv) picos característicos a 242,8 ppm, 233,8 ppm, 219,0 ppm, 171,7 ppm, 86,9 ppm, 54,9 ppm, 11,3 ppm y -5,5 ppm en un sólido espectro de RMN N^{15} en estado sólido.

14. Una composición farmacéutica que comprende un cristal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Una composición farmacéutica para uso como inhibidor de CDK4/6, que comprende un cristal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 como ingrediente activo.
- 5 16. Un cristal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en la profilaxis o tratamiento de artritis reumatoide, arterioesclerosis, fibrosis pulmonar, infarto cerebral y/o cáncer.

FIG1

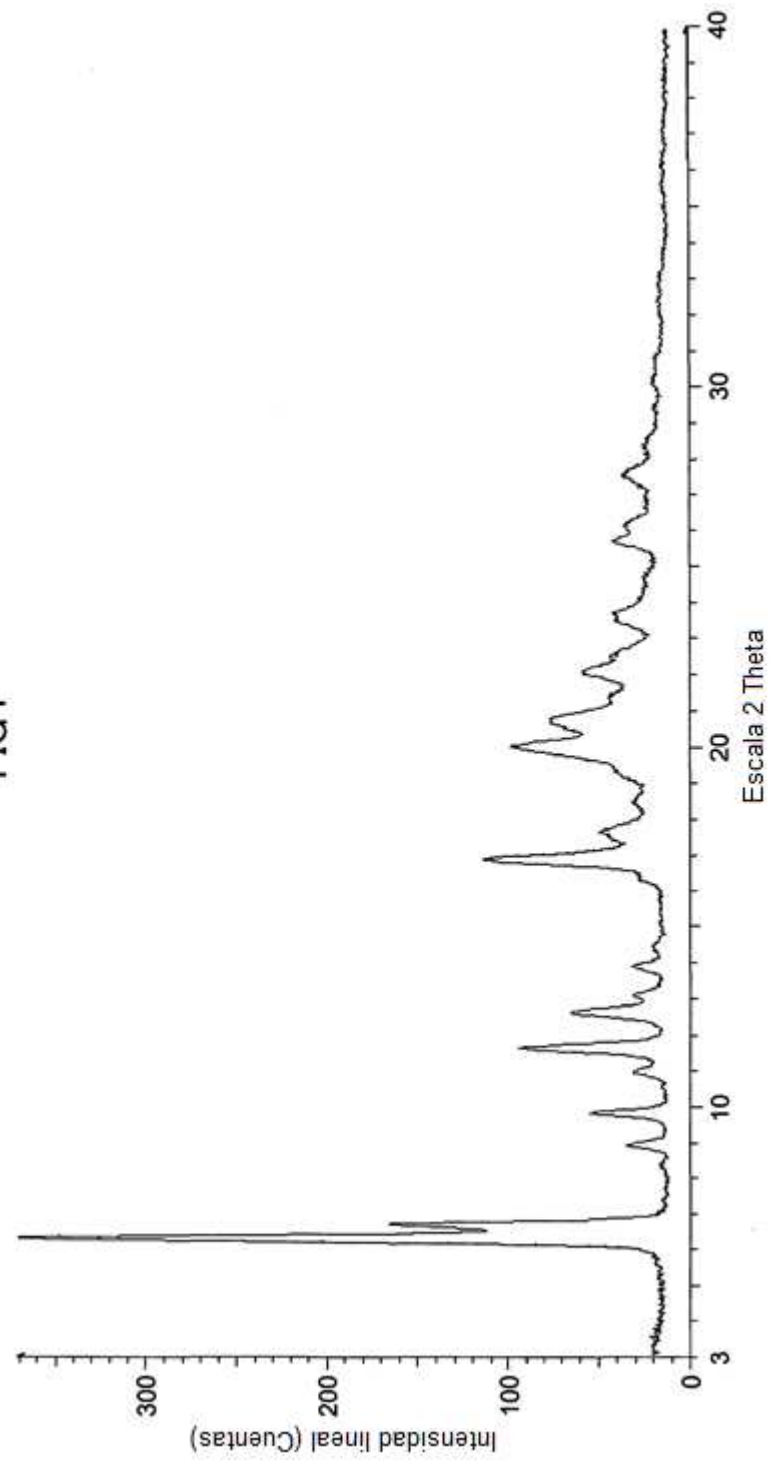


FIG2

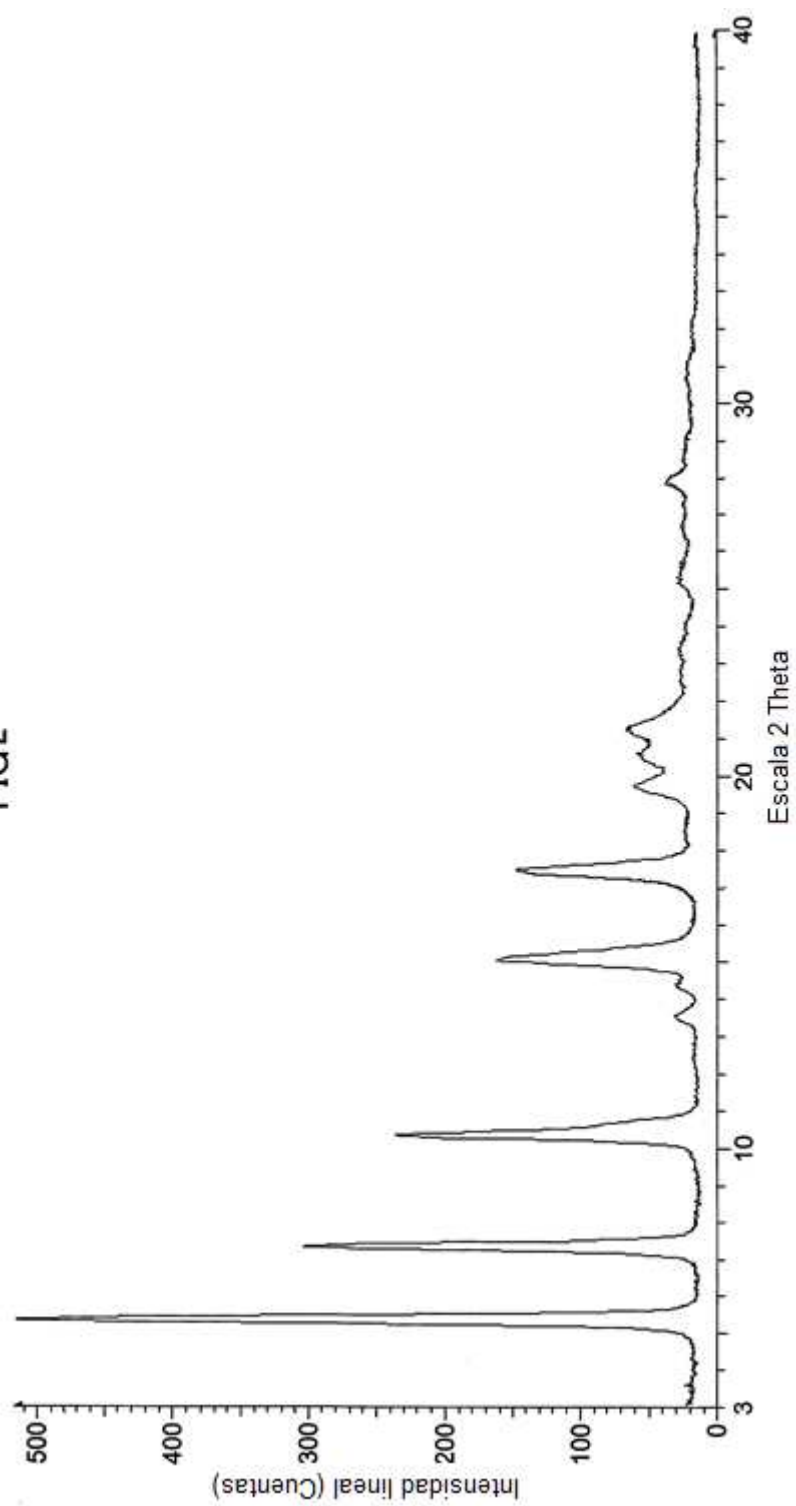


FIG 3

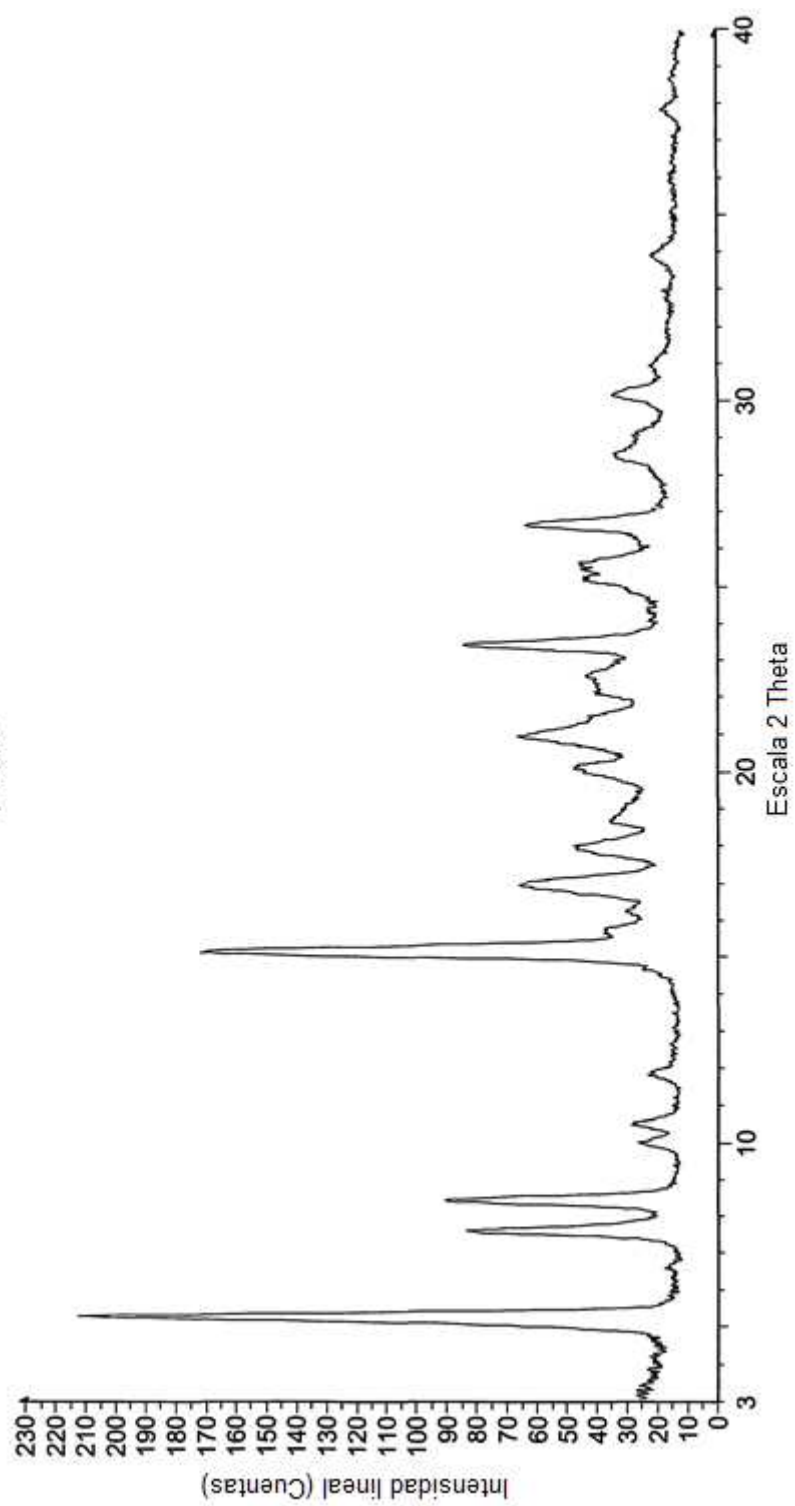


FIG 4

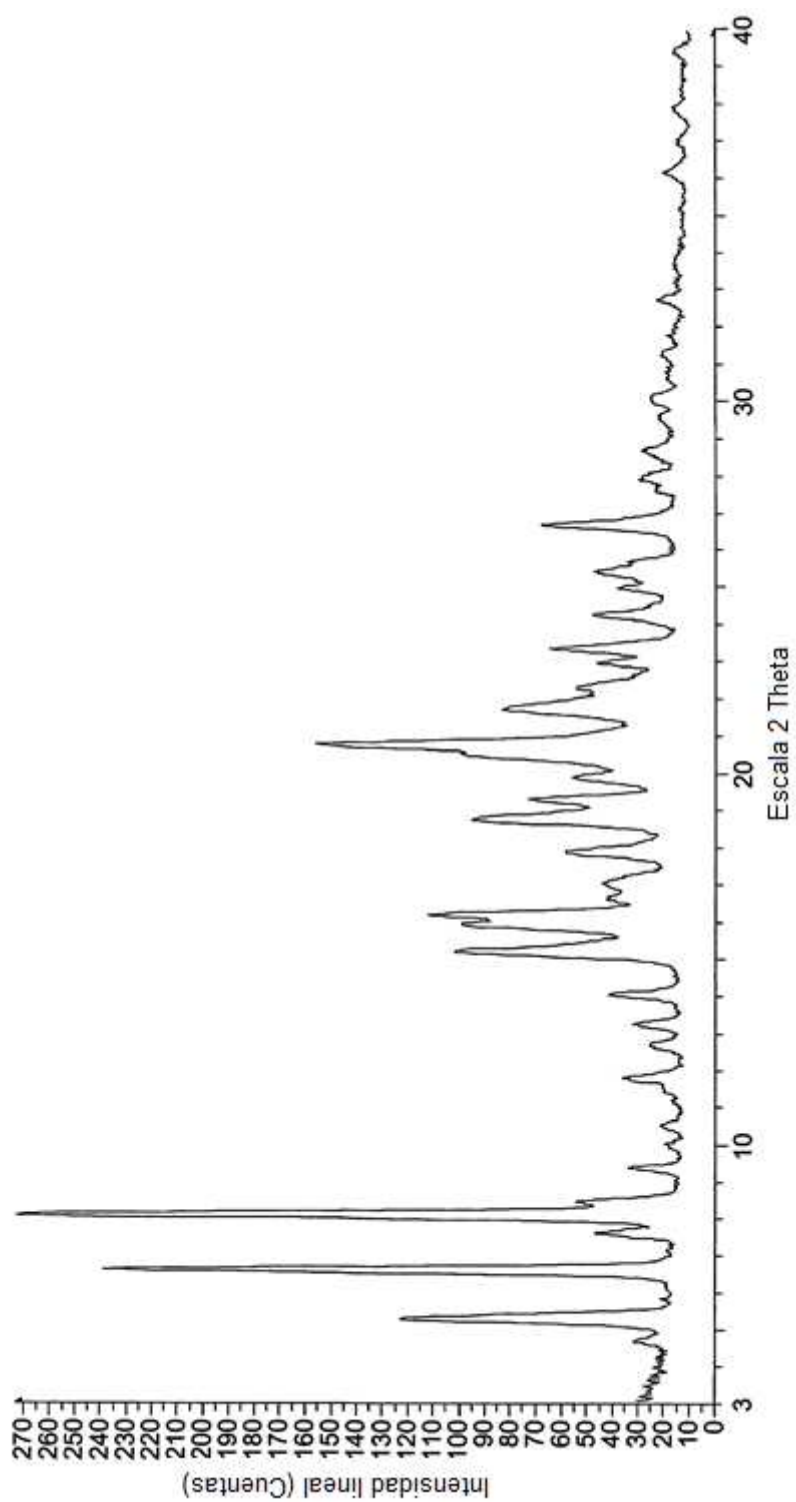


FIG 5

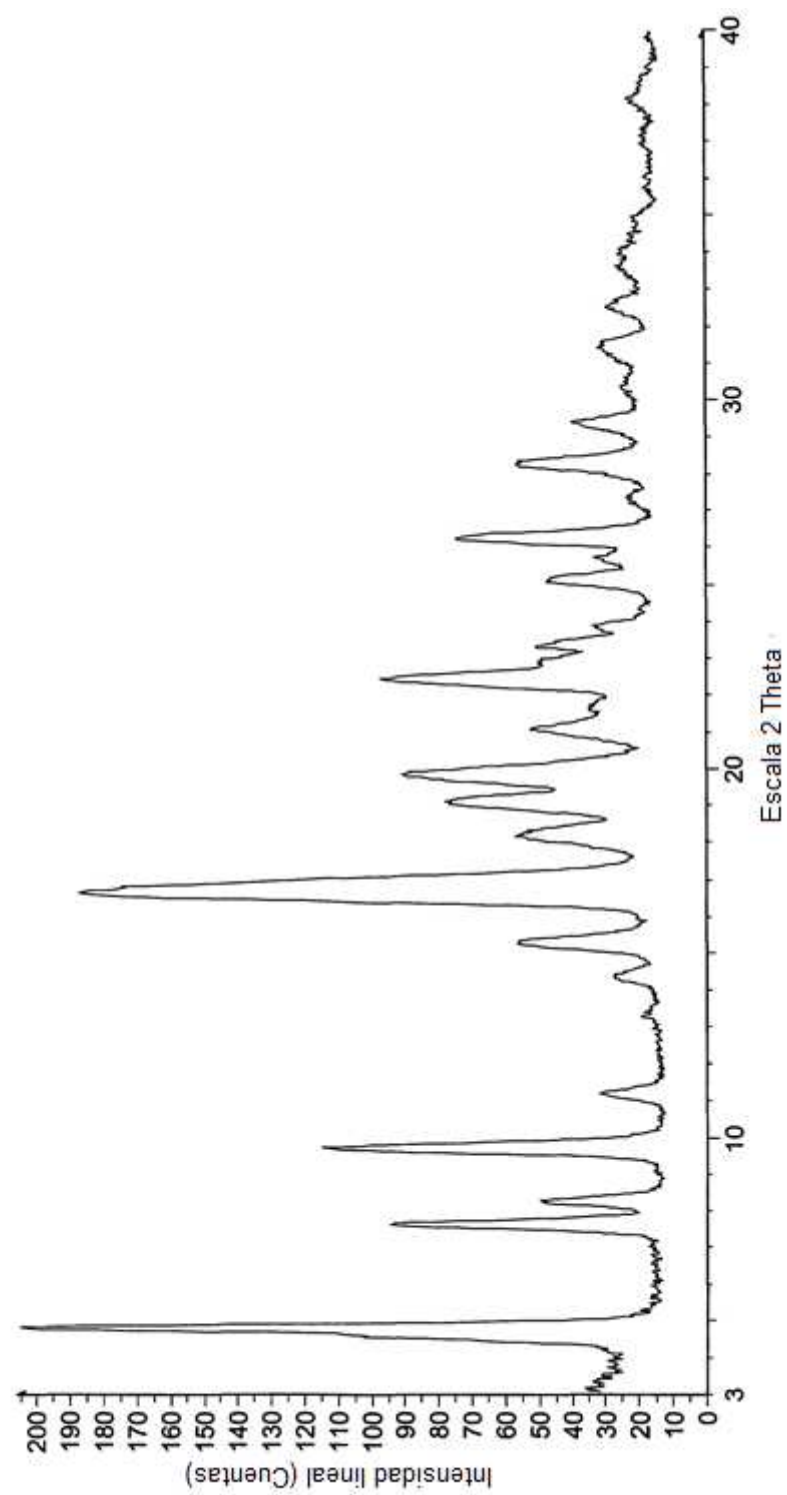


FIG 6

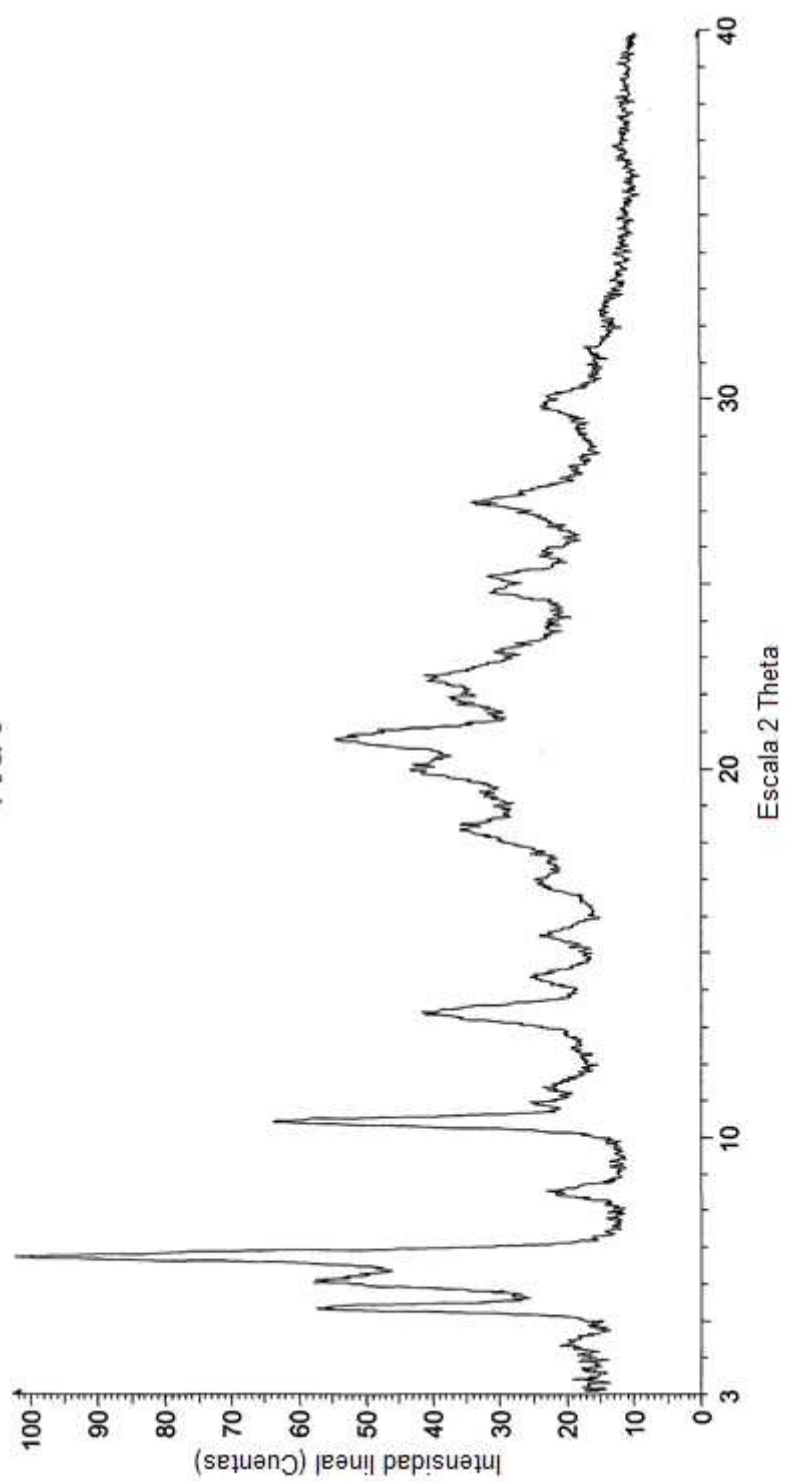
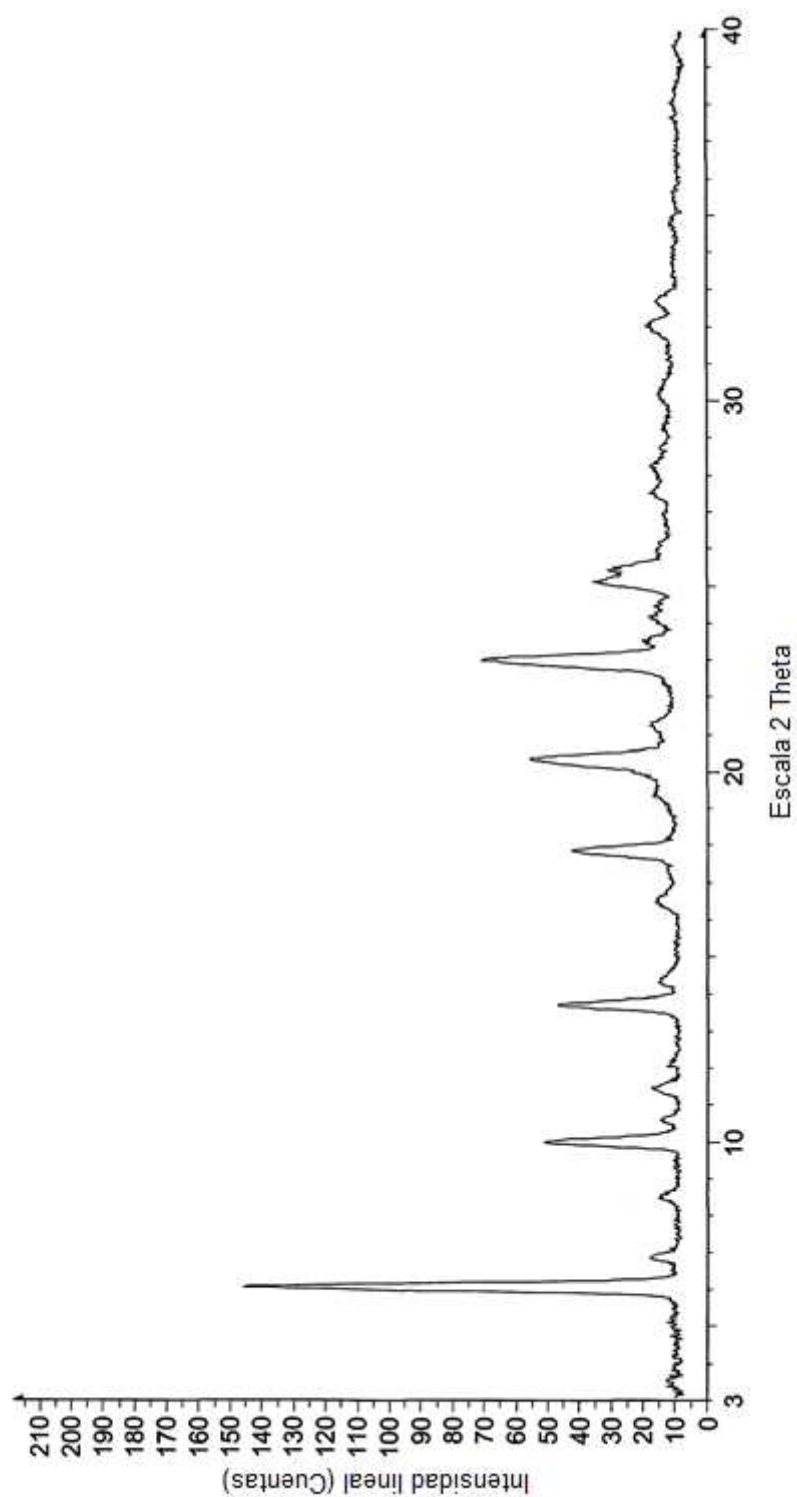


FIG 7



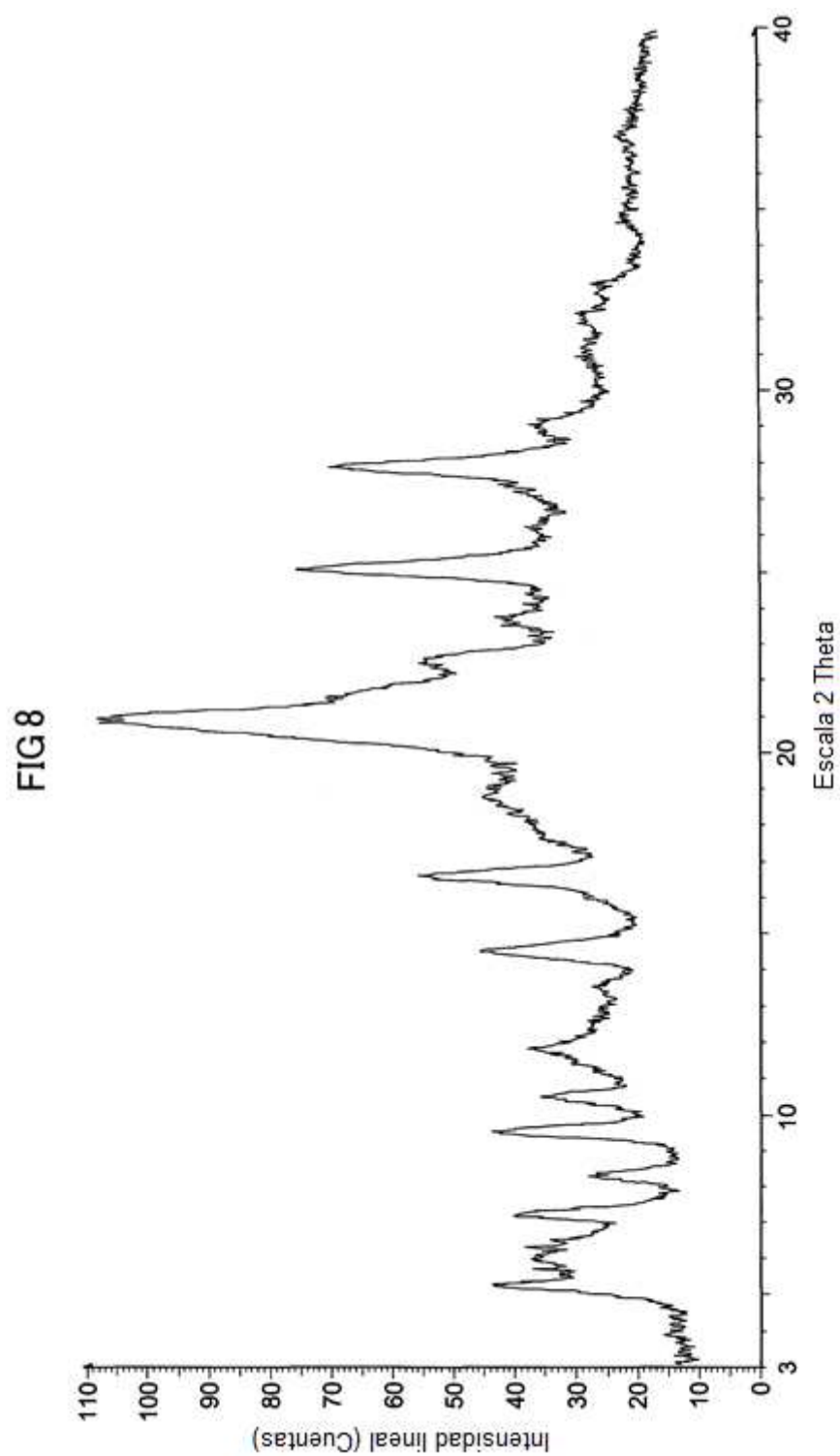


FIG 9

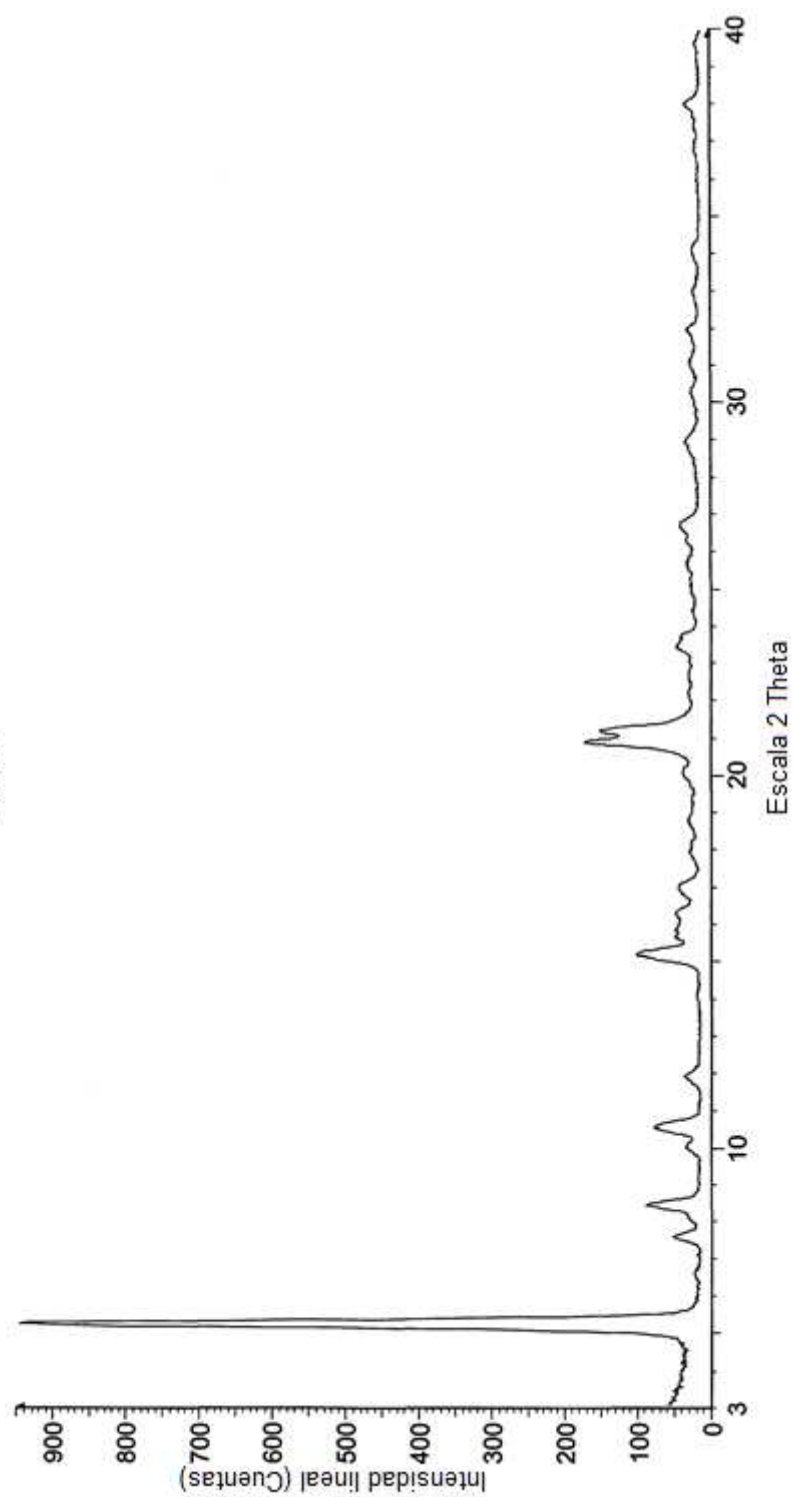


FIG10

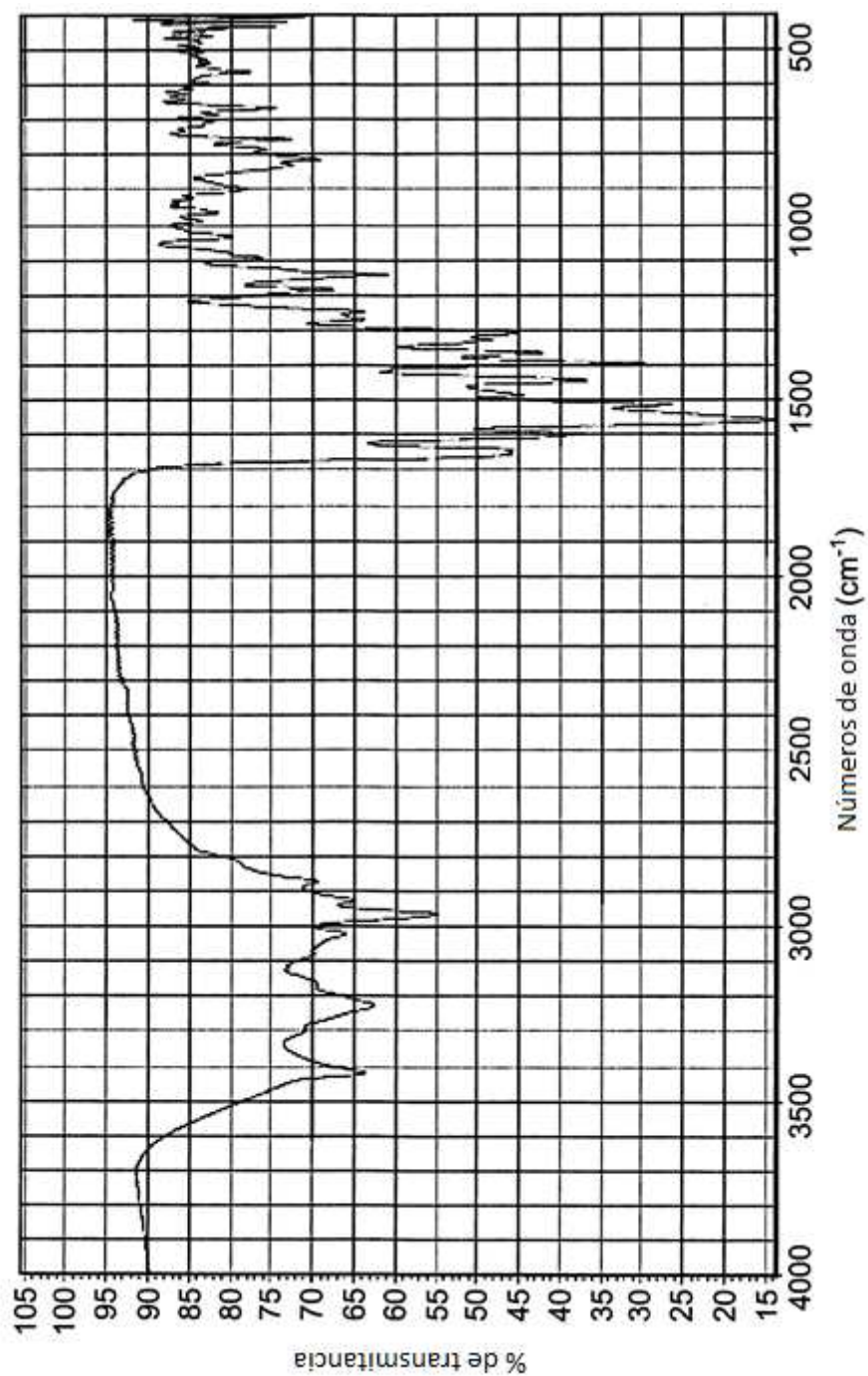


FIG11

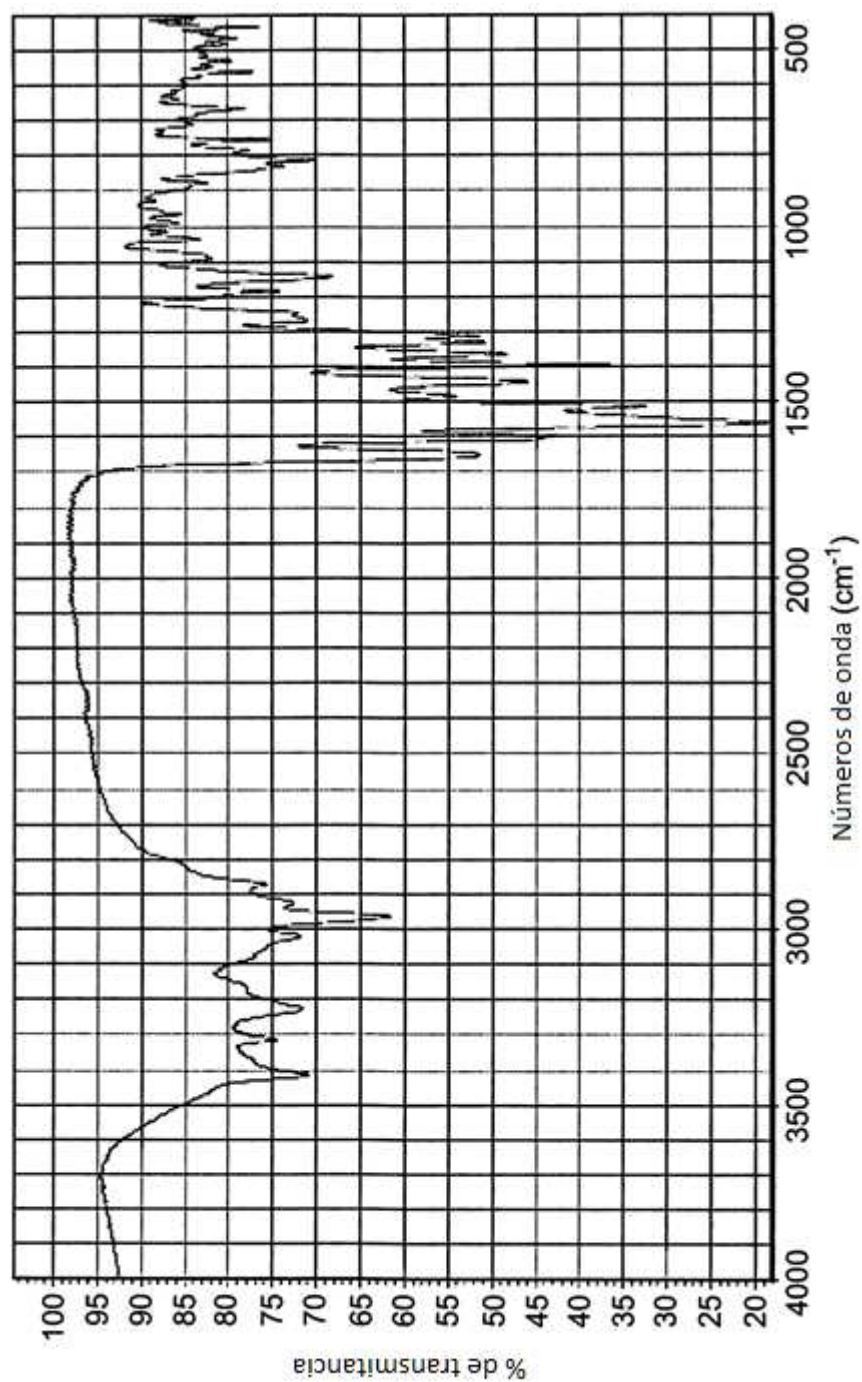


FIG12

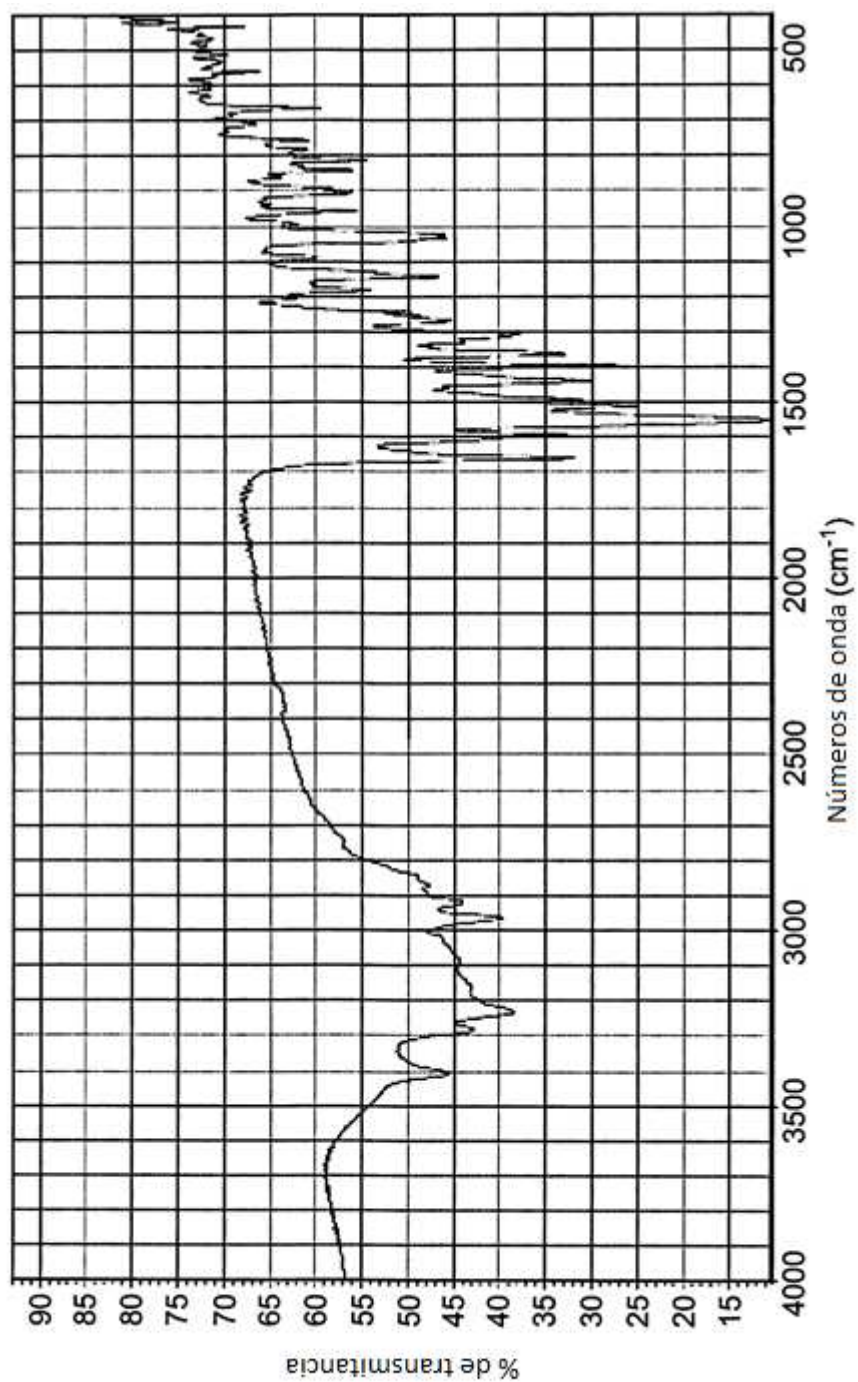


FIG13

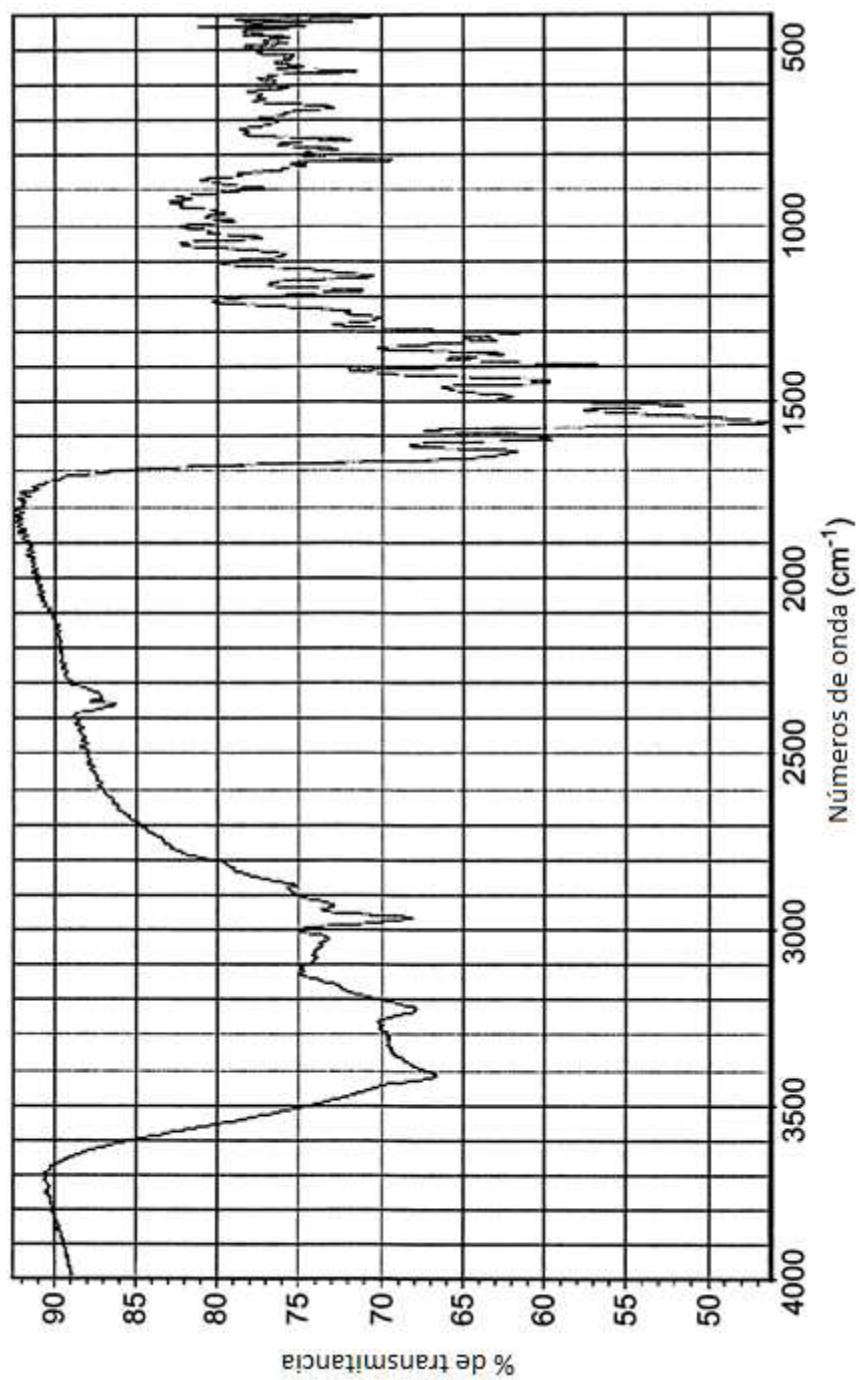


FIG 14

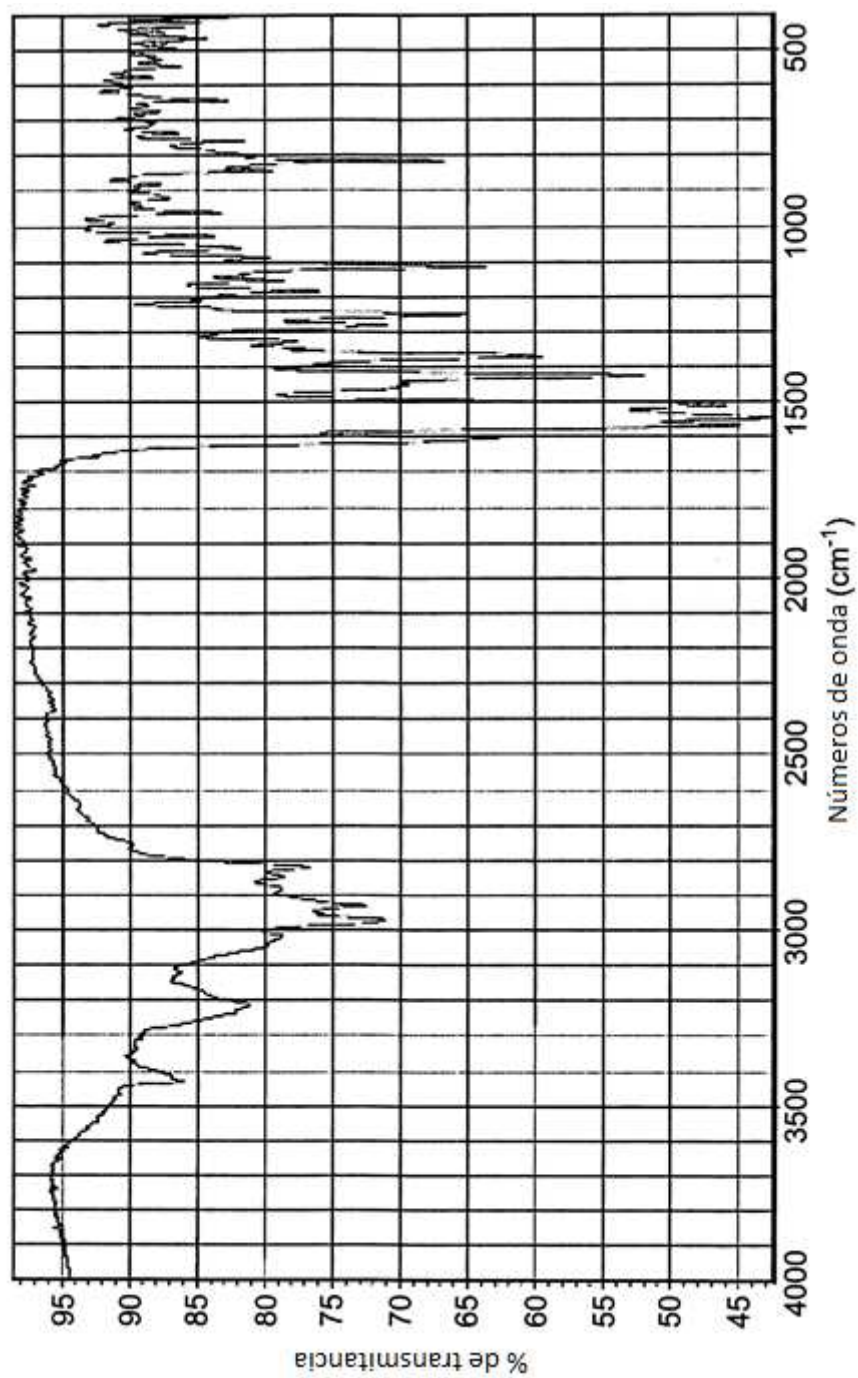


FIG 15

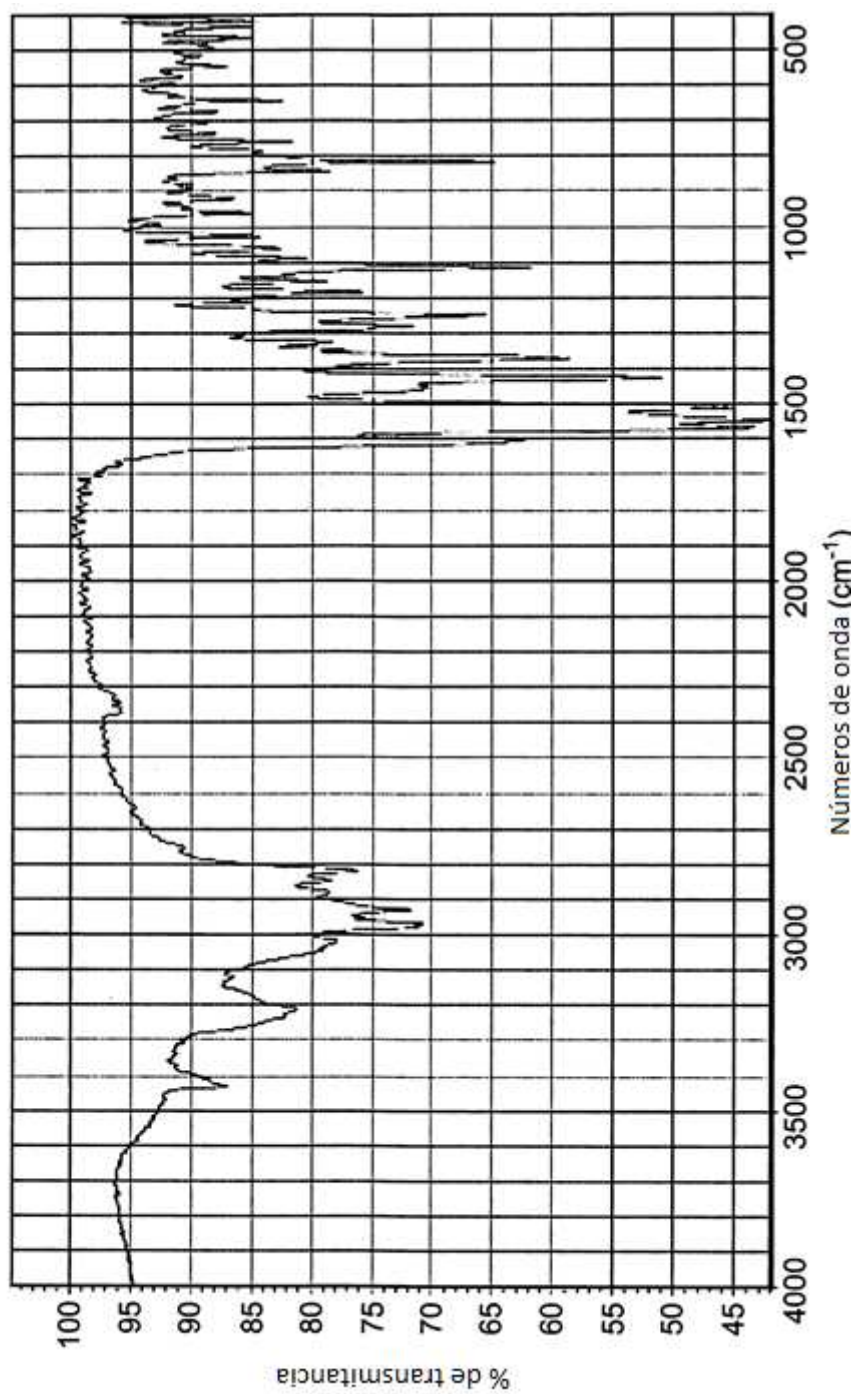
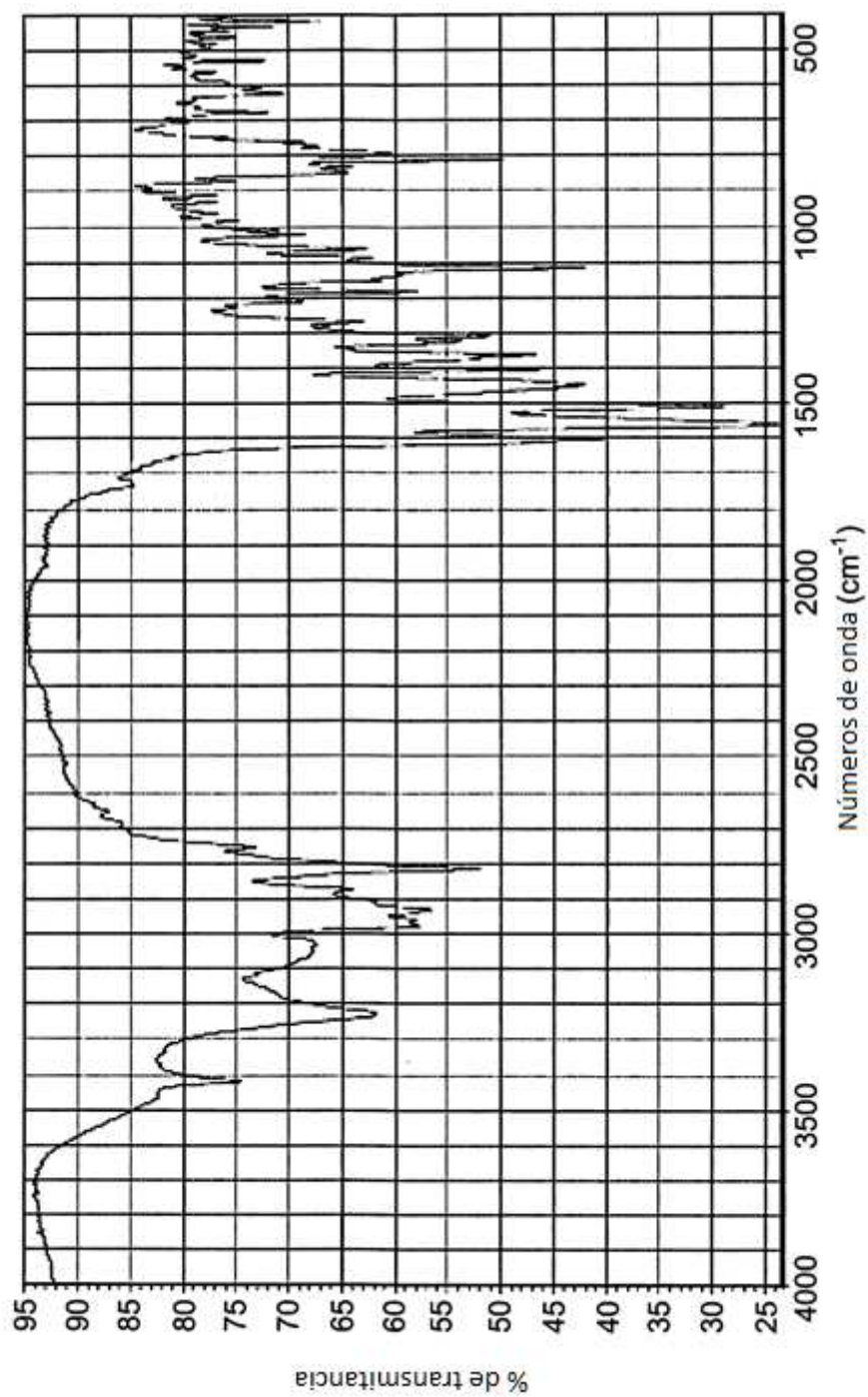


FIG16



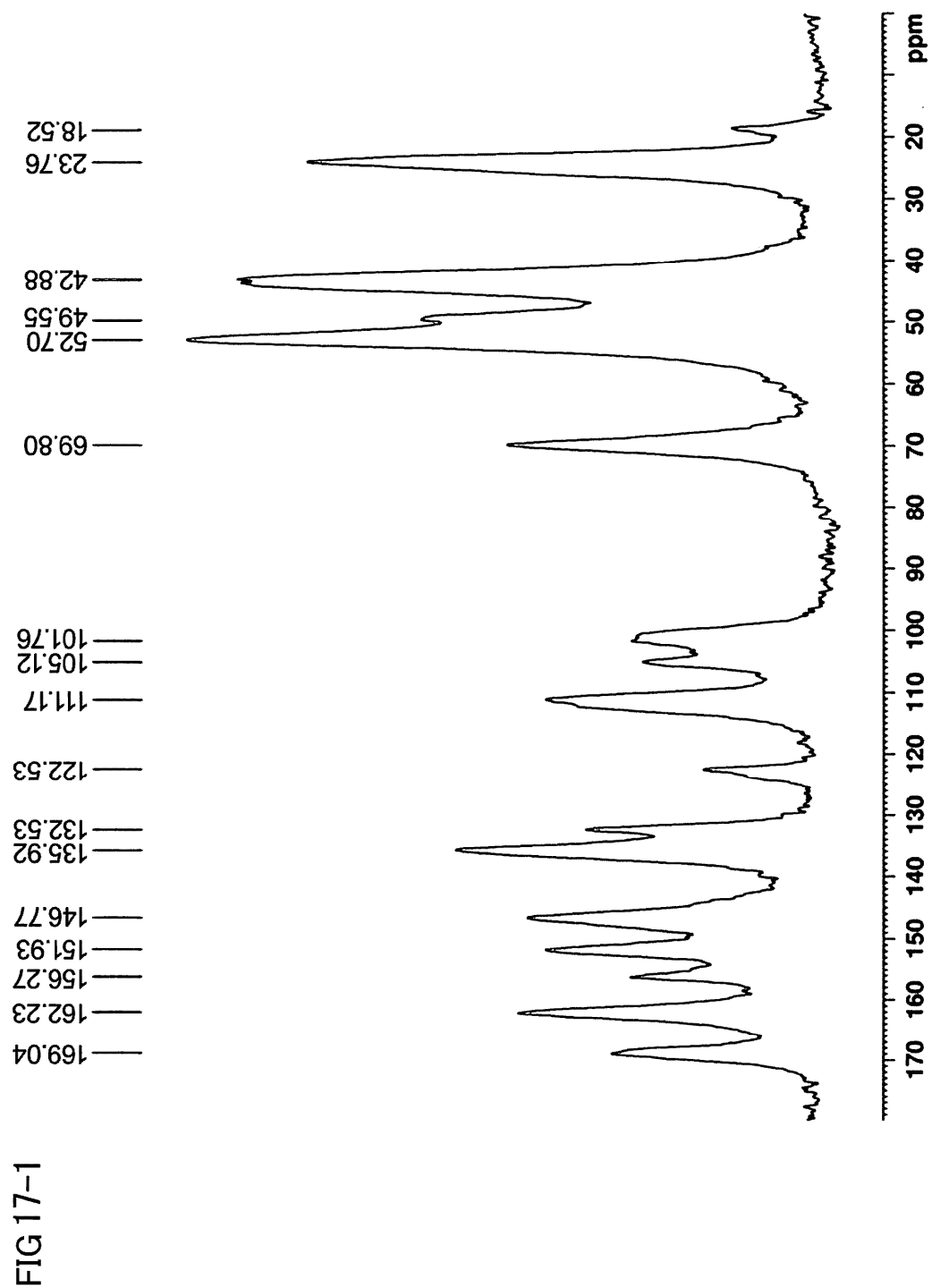
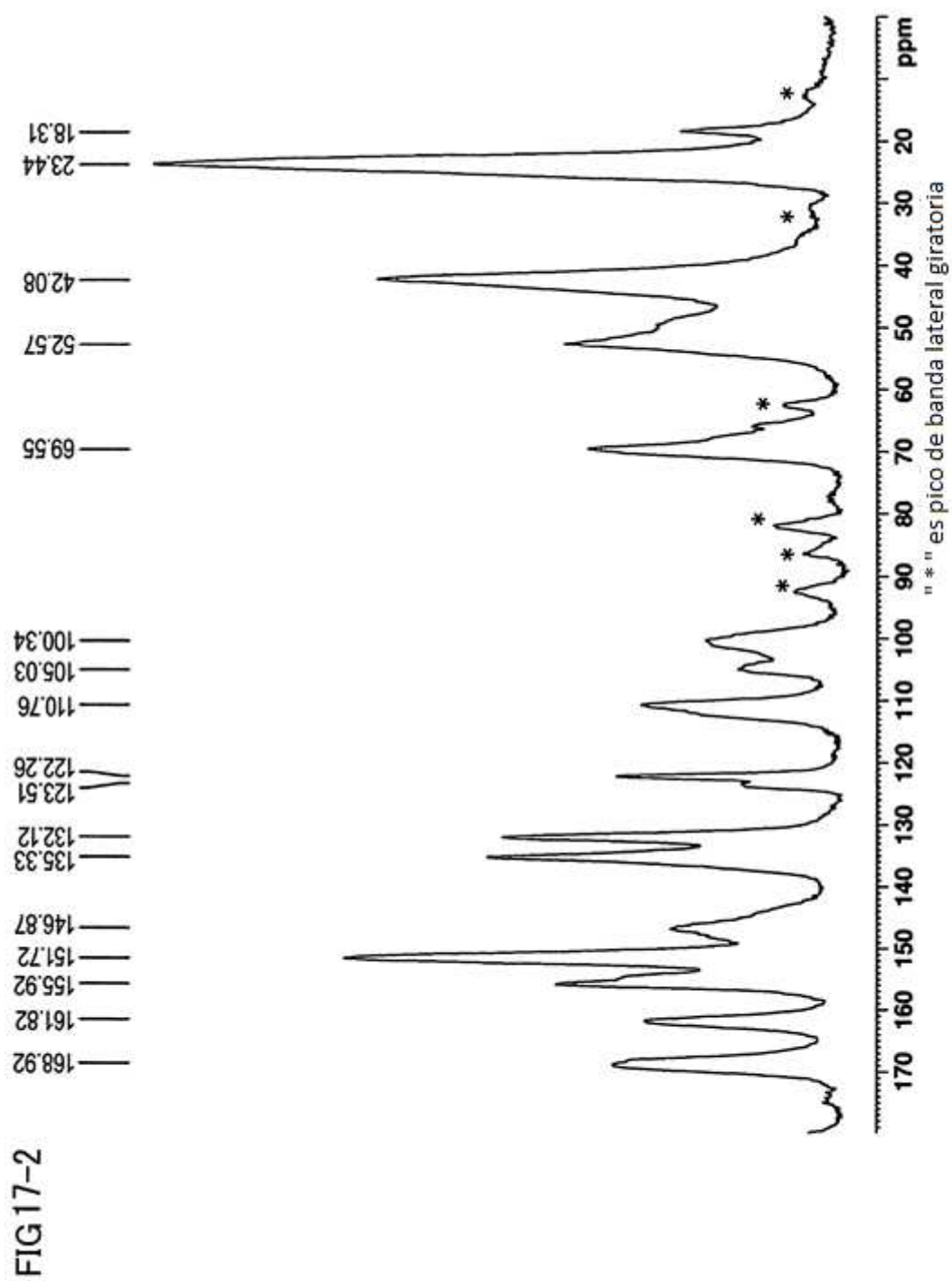


FIG 17-1



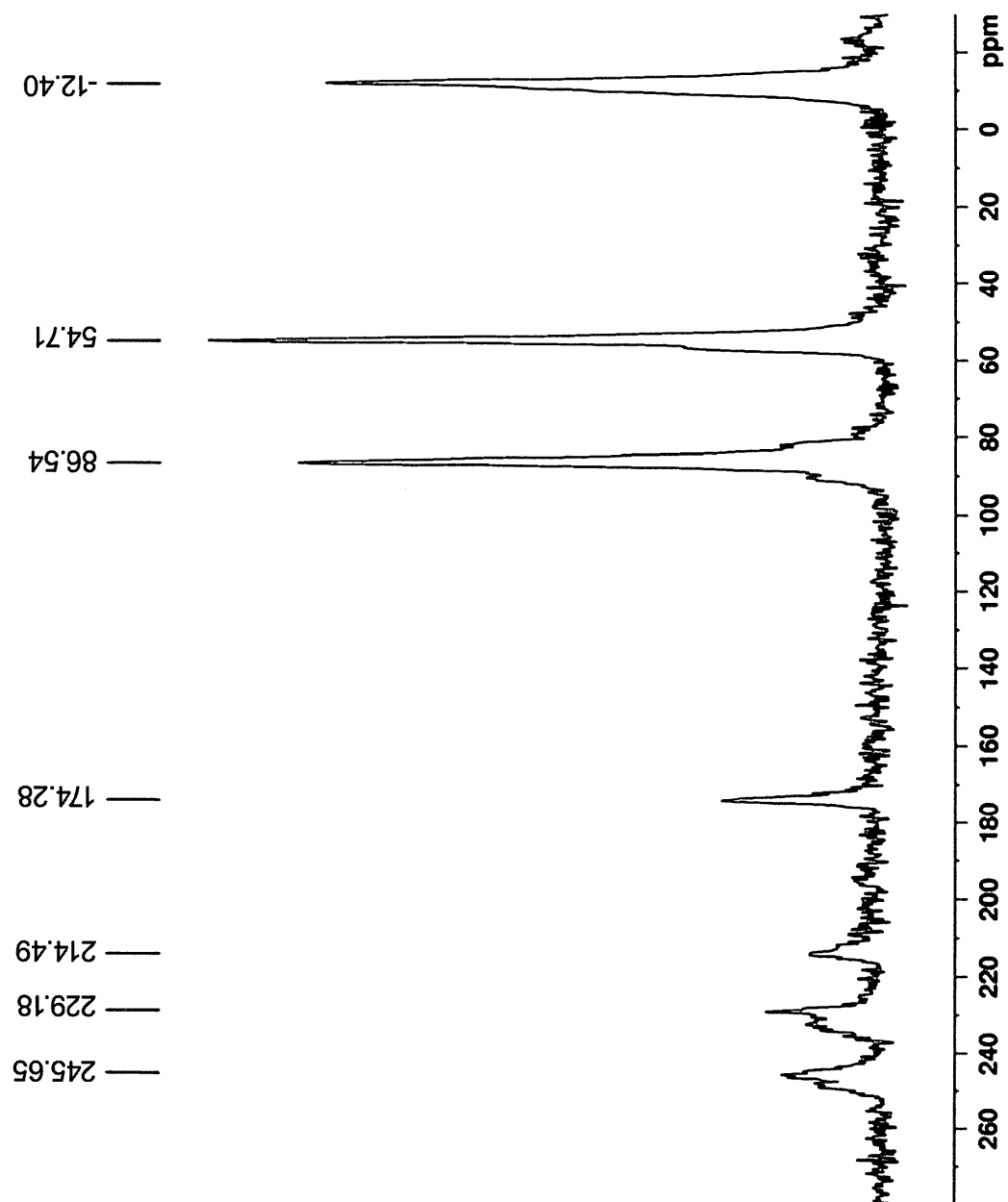


FIG 18

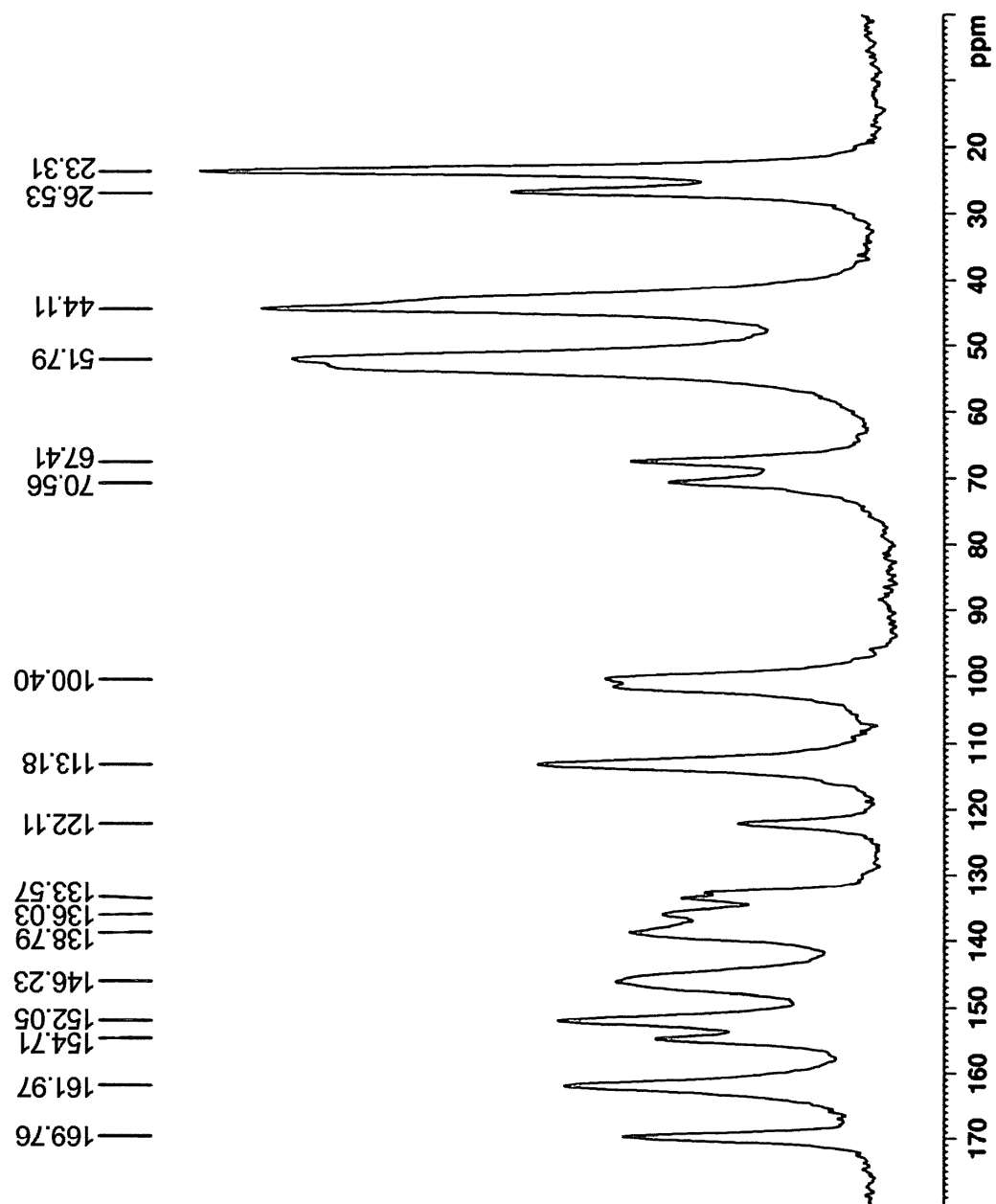
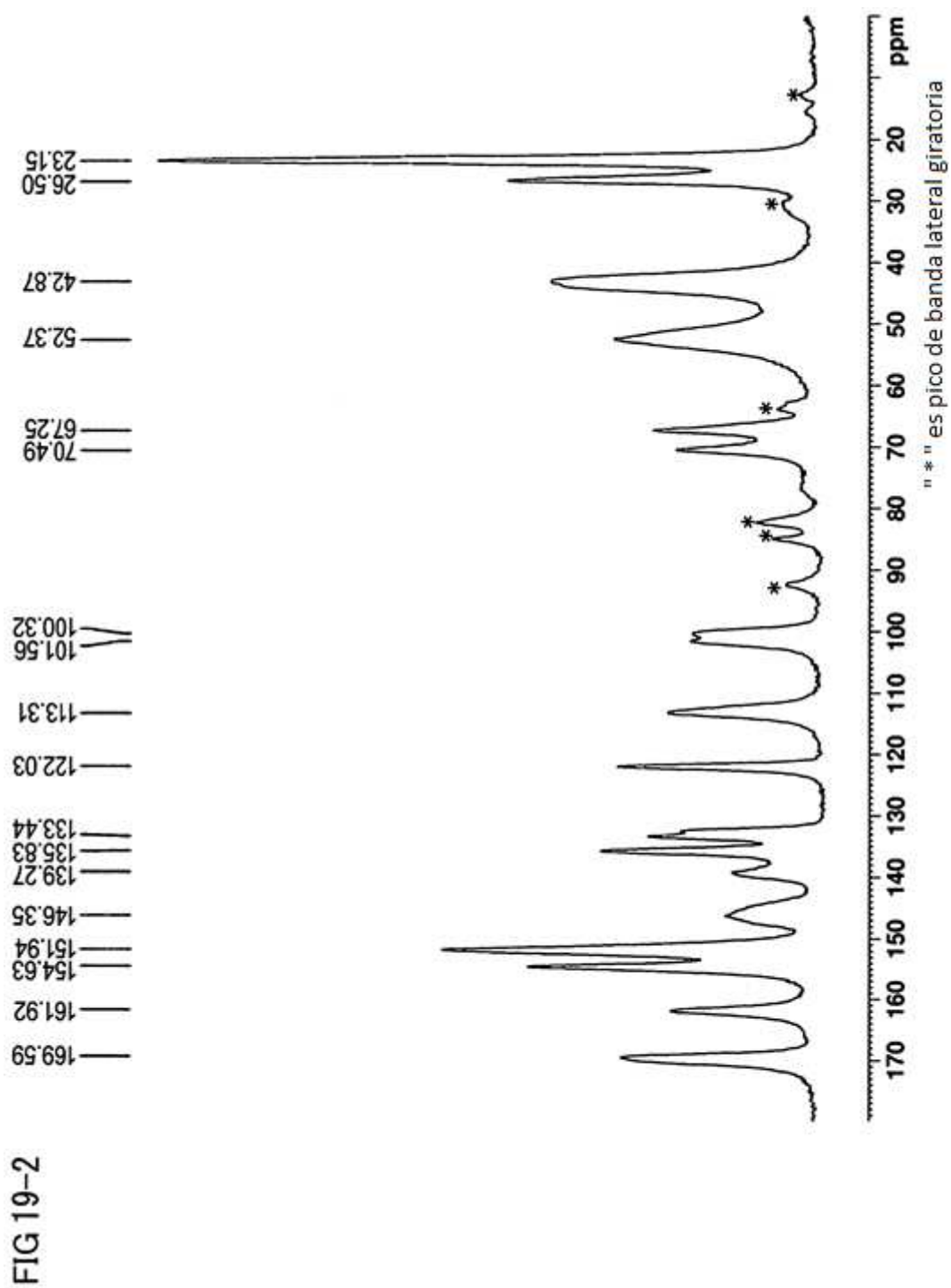


FIG 19-1



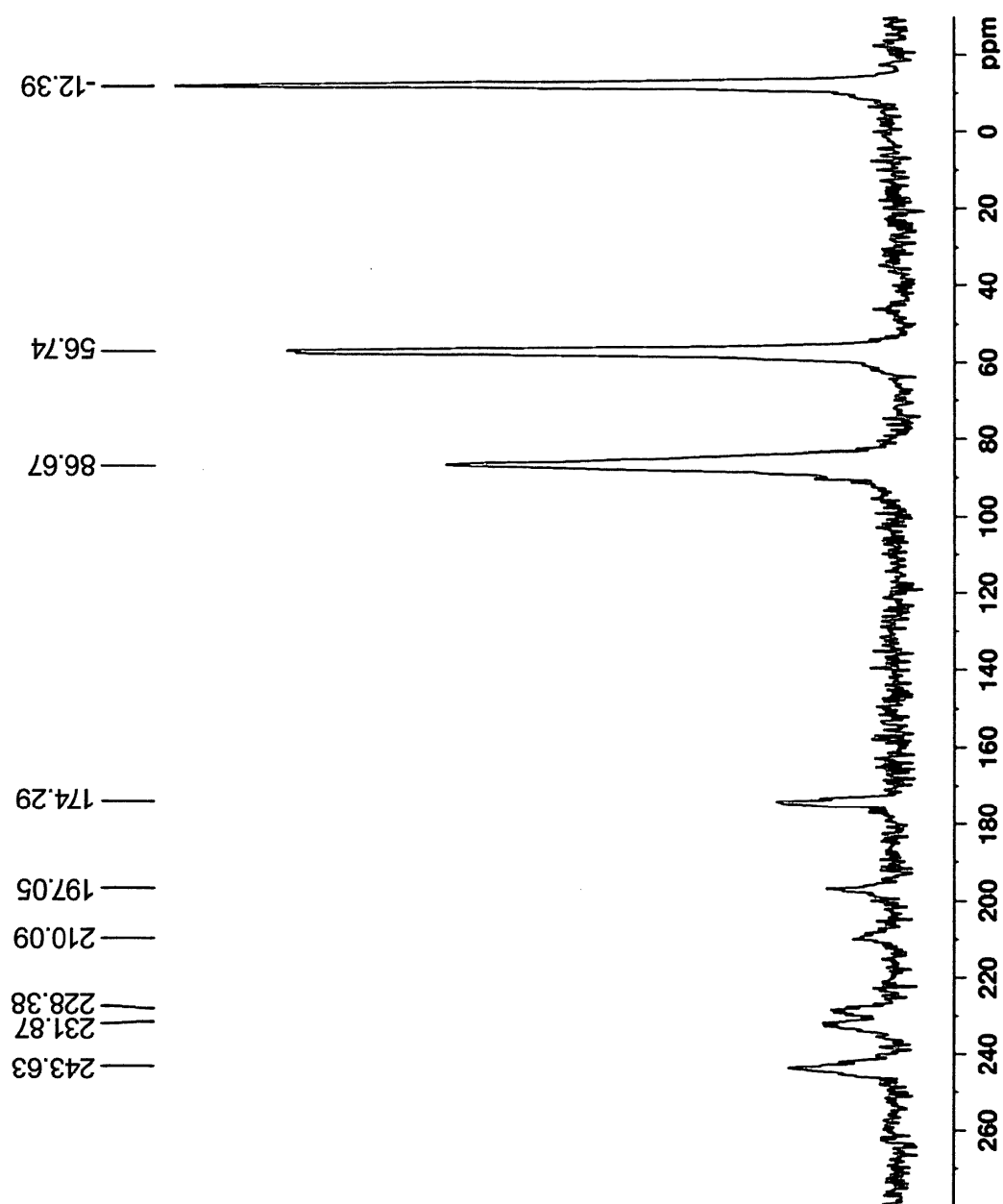


FIG 20

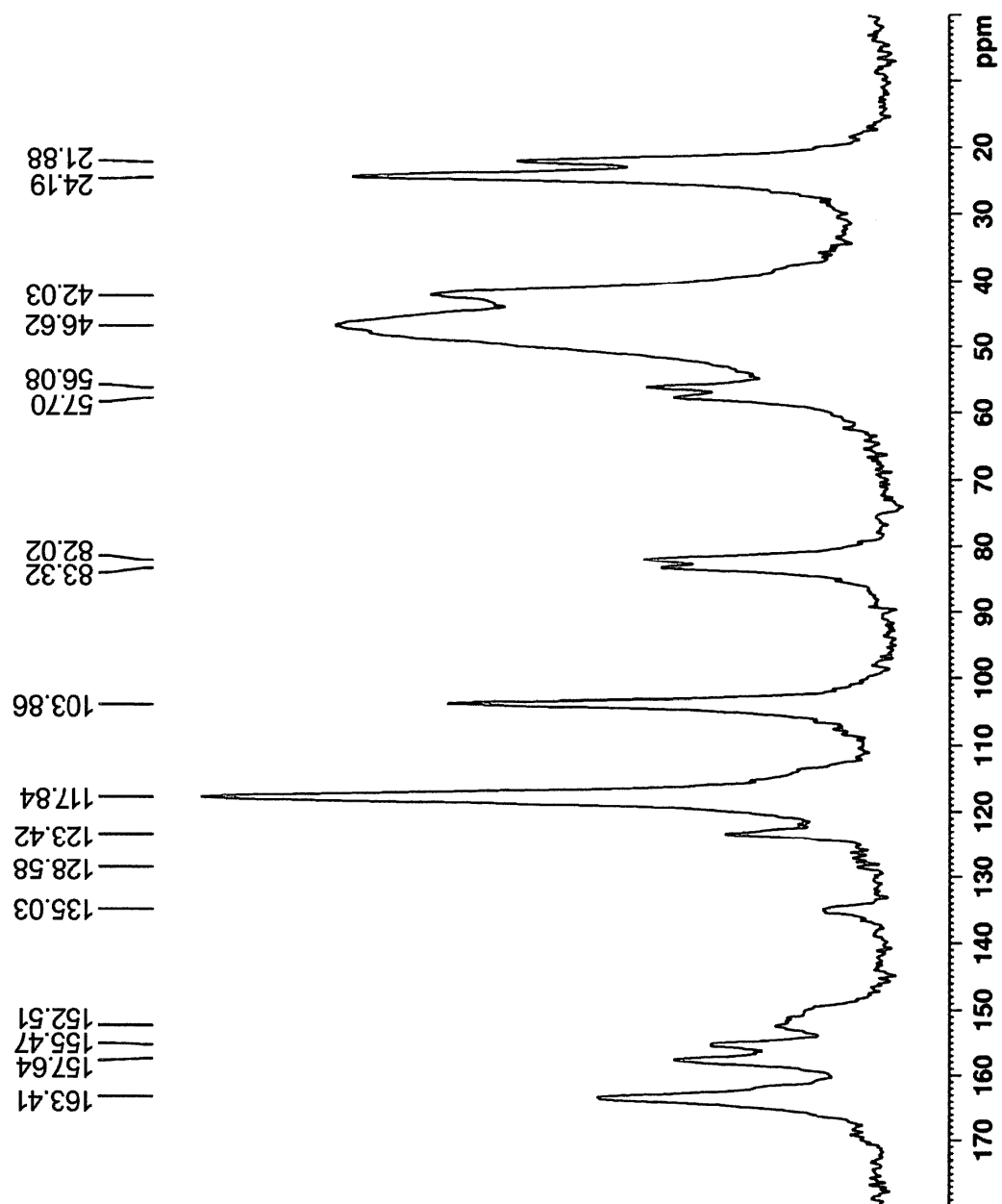


FIG 21-1

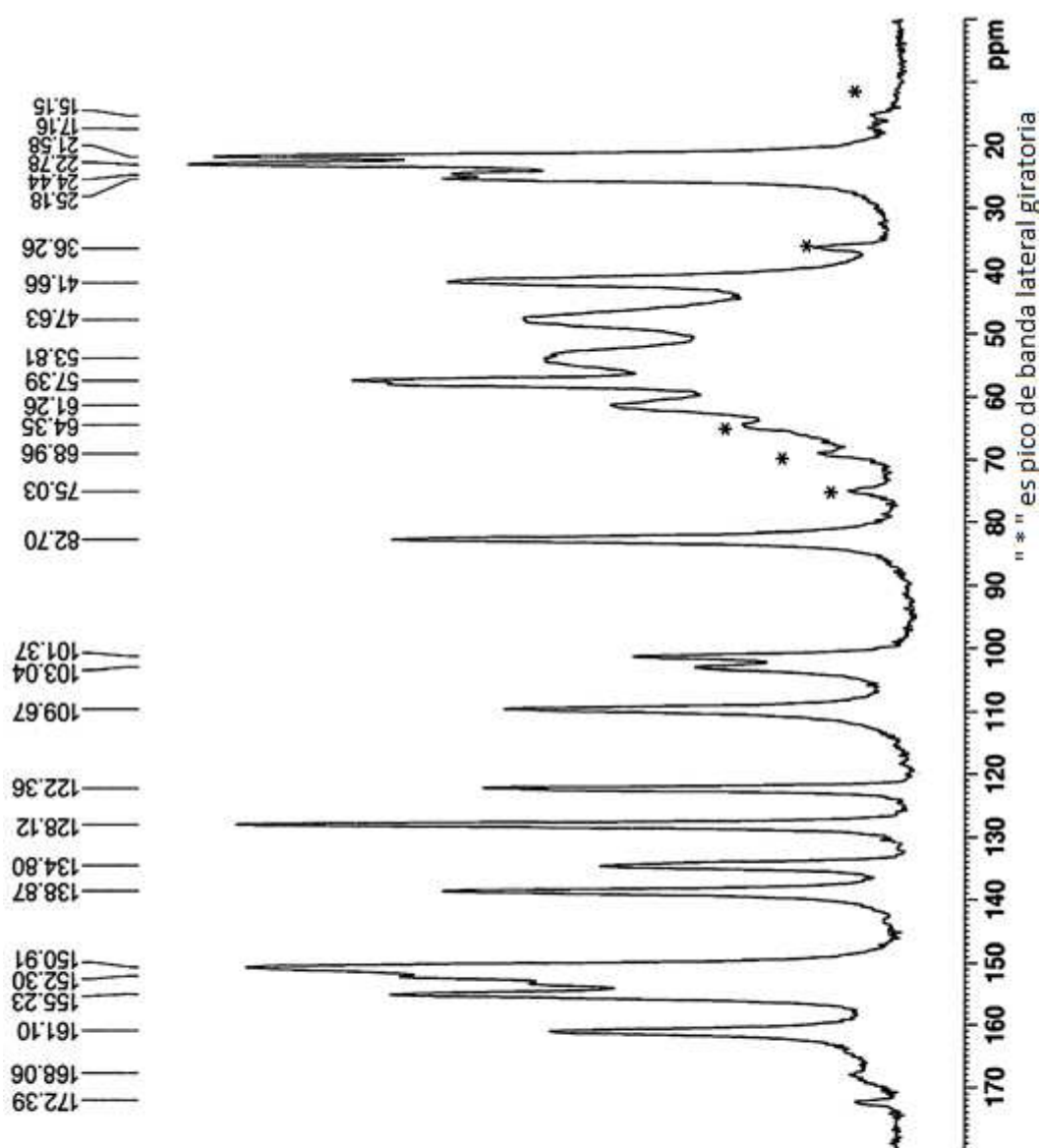


FIG21-2

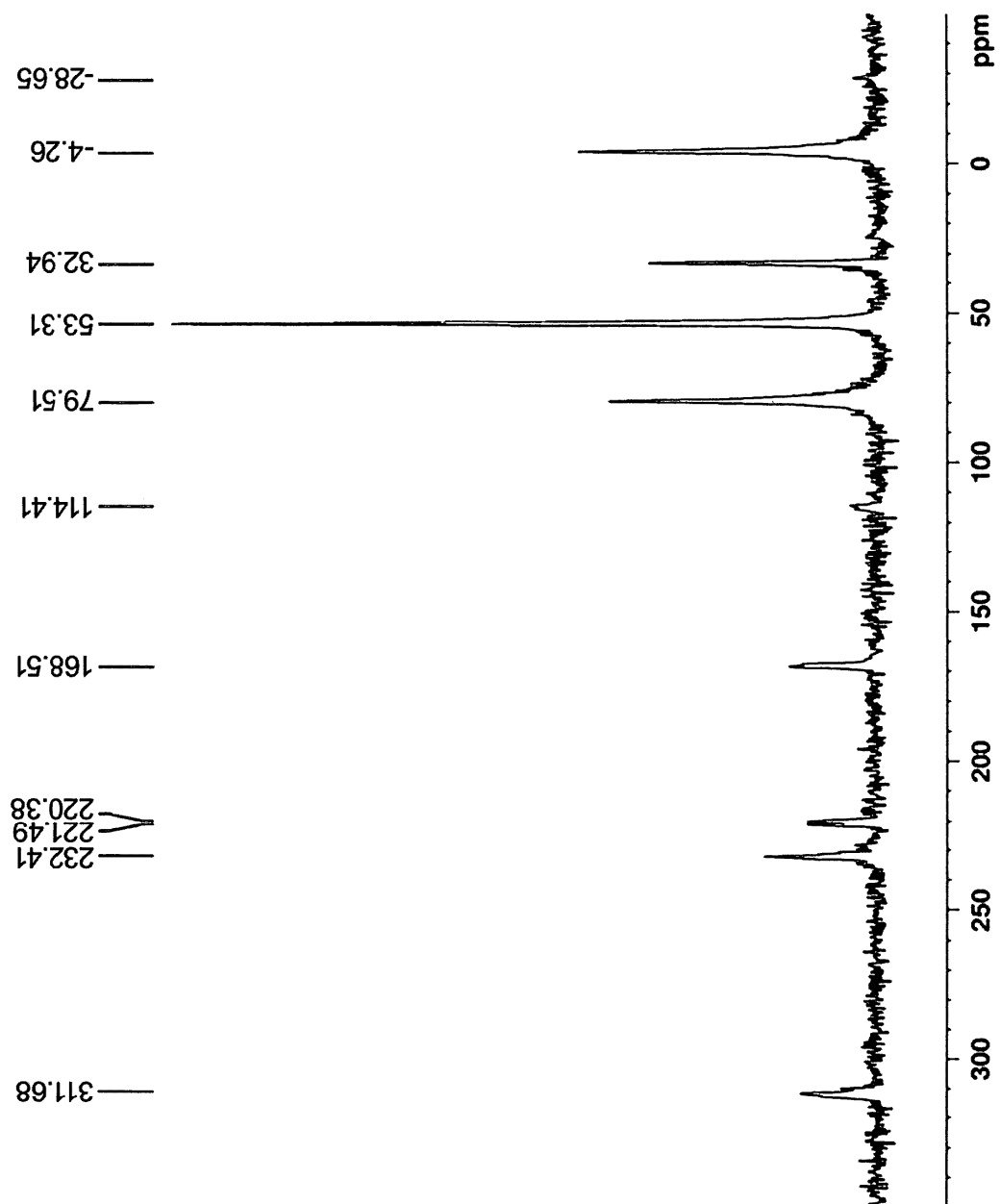


FIG 22

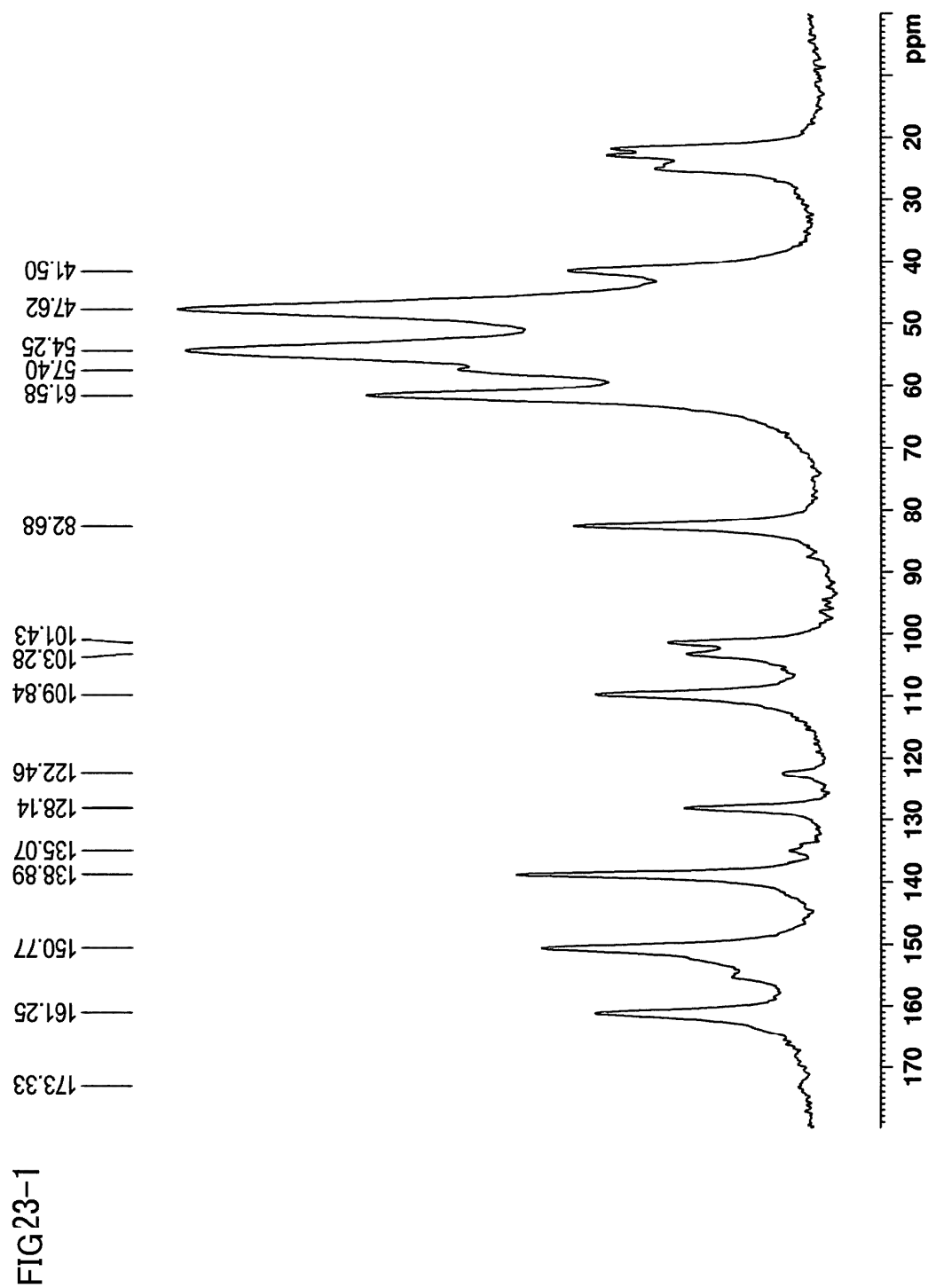
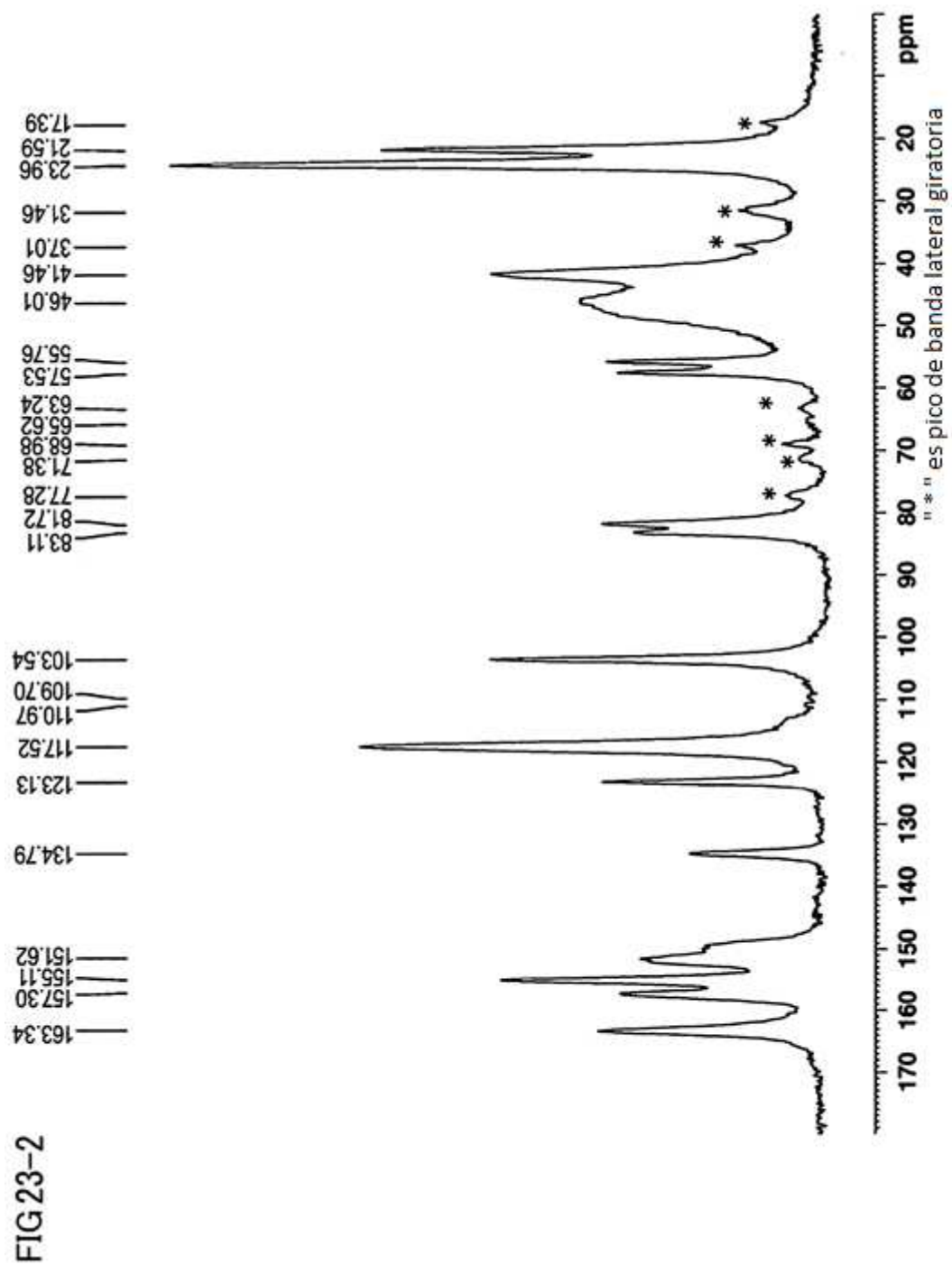


FIG23-1



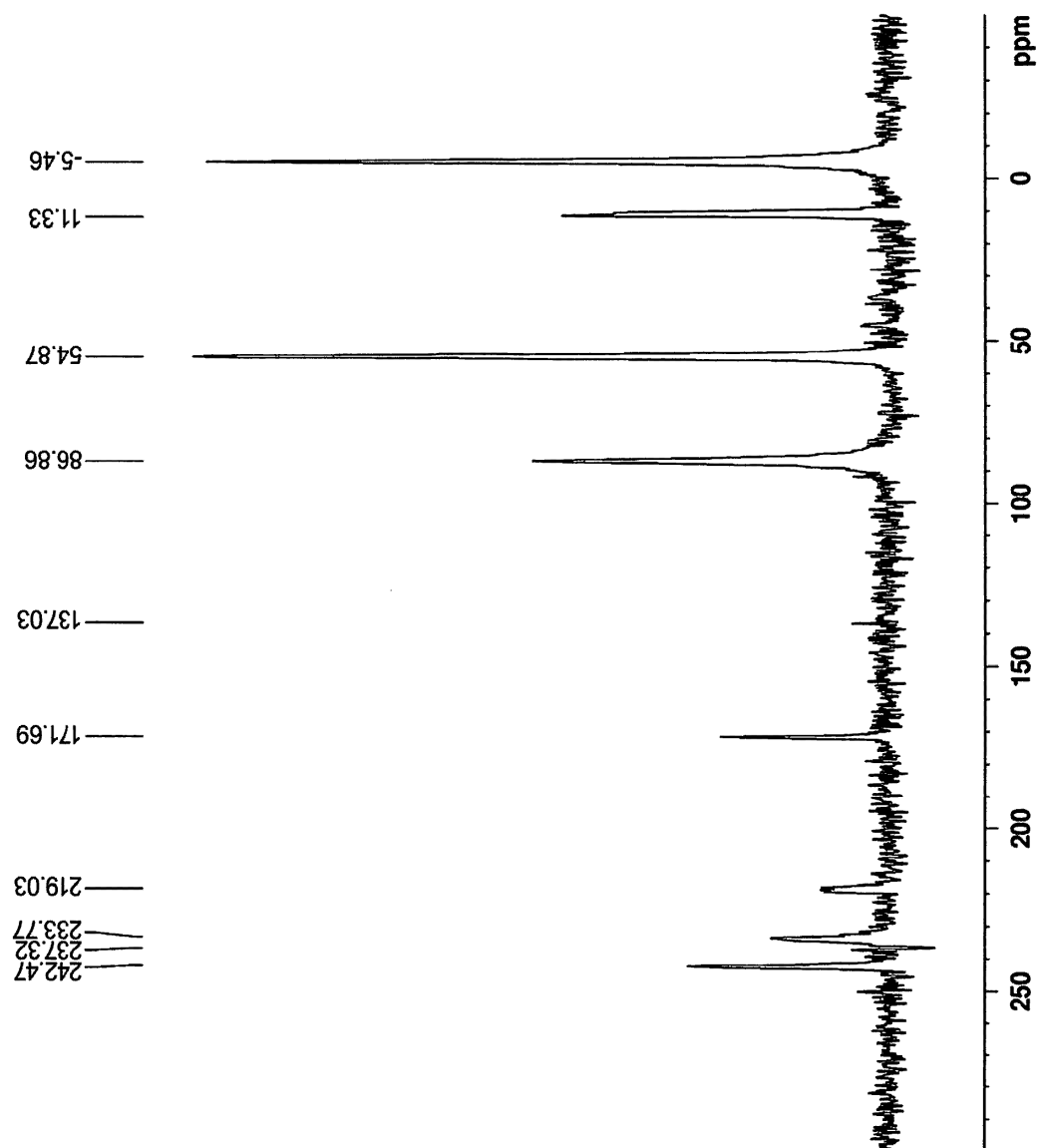


FIG 24