

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0613639-7 A2**

(22) Data de Depósito: 29/06/2006
(43) Data da Publicação: 22/02/2012
(RPI 2146)



(51) *Int.Cl.:*
C07D 487/04
A61K 31/4162
A61K 31/4709
A61P 35/00

(54) **Título:** COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM COMPOSTO

(57) **Resumo:** COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM COMPOSTO. A presente invenção fornece 2-(6-metil-piridin-1-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il]-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-j]pirazol monoidratado cristalino.

(30) **Prioridade Unionista:** 22/07/2005 US 60/701641

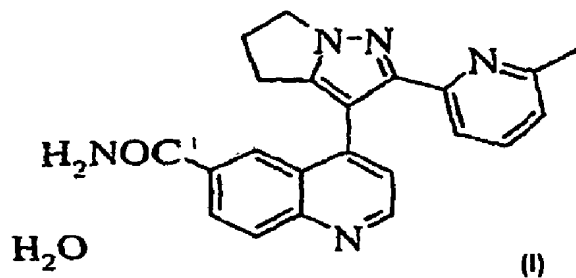
(73) **Titular(es):** Eli Lilly And Company

(72) **Inventor(es):** Sreenivasa Reddy Mundla

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006025377 de 29/06/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/018818de 15/02/2007



“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM COMPOSTO”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) é um protótipo para uma grande família de fatores de crescimento e diferenciação que regulam o desenvolvimento. Os membros da família TGF- β ativam as cinases do receptor da treonina/serina transmembrana, desse modo iniciando uma cascata de sinalização via Smads, uma nova classe de efetores de sinalização intracelulares que regulam a expressão genética. O TGF- β é um potente indutor da detenção do crescimento em muitos tipos de células, incluindo células epiteliais. Esta atividade é a base do papel supressor do tumor do sistema de sinalização de TGF- β em carcinomas. Outras atividades, incluindo diferenciação epitelial-a-mesenquimal induzida por TGF- β , contribuem para a progressão do câncer.

A sinalização da família TGF- β é de especial relevância na diferenciação mesenquimal, incluindo desenvolvimento ósseo. A expressão ou ativação desreguladas dos componentes deste sistema de sinalização podem contribuir para doenças esqueléticas, p. ex., osteoartrite. Vide Wakefield et al. (2002) Current Opinion in Genetics & Development 12:22-29; Siegel et al. (2003) Nature Reviews (Cancer) 3: 807-820; Dumont et al. (2003) Cancer Cell 3: 531 – 536,

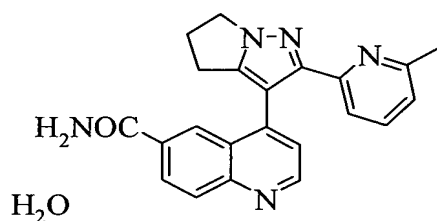
O pedido de patente PCT WO 02/0948332 descreve um gênero de compostos de diidropirrolpirazol úteis para tratar distúrbios associados com a atividade ou superprodução de sinalização TGF- β aumentada O pedido de patente PCT WO 04/04382 descreve uma forma anidra de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol.

Foi surpreendentemente descoberto que 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol pode ser preparado em uma forma de monoidrato cristalino, tendo as propriedades

vantajosas em relação à forma anidra de superiores propriedades de manuseio de sólido em uma larga escala, facilidade de purificação por cristalização e estabilidade termodinâmica sob condições de processamento e armazenagem farmacêuticos. Um processo de manufatura para a nova forma foi também descoberta.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il]-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado, i.e., Fórmula I.



Fórmula I

A presente invenção fornece 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il]-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado em uma forma cristalina.

A presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il]-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol e um excipiente, diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção fornece um método de inibir a sinalização de TGF- β em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il]-5,6-diidro-4H-pirrolo [1,2-b]pirazol.

A presente invenção fornece ainda um método de tratar condições resultantes de excessiva produção de TGF- β em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de tal tratamento

uma quantidade supressora de sinal TGF- β de monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol. Em razão de os compostos da presente invenção serem inibidores da sinalização de TGF- β , eles são úteis para o tratamento de uma variedade de distúrbios, incluindo o tratamento de neoplasmas susceptíveis.

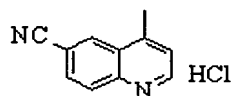
Em um de seus aspectos do método, esta invenção é dirigida a um método para tratar neoplasmas susceptíveis, compreendendo administrar a um paciente em necessidade dele uma quantidade eficaz de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado.

A presente invenção fornece monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol para uso em terapia. A presente invenção provê o uso de monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol para a manufatura de um medicamento para o tratamento de distúrbios associados com a atividade ou superprodução da atividade de sinalização de TGF- β aumentada.

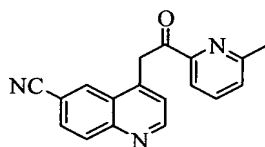
Em outra forma de realização, esta invenção provê um processo para produzir monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol e novos intermediários úteis para produzir monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol cristalino: cloridreto de 6-ciano-4-metil-quinolino, 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona; 1-amino)-2-pirrolidinona, sulfonato de p-tolueno; 1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolin-4-il)-etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona; e 3-(6-ciano-quinolin-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo [1,2-b]pirazol.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

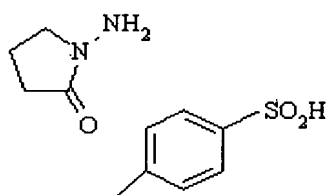
Como aqui usada, a expressão " cloridreto de 6-ciano-4-metil-quinolino " refere-se a



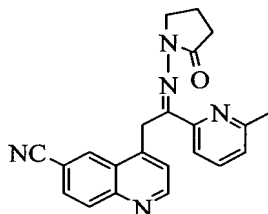
A expressão "2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona" refere-se a



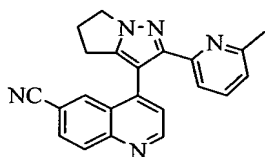
A expressão "1-amino)-2-pirrolidinona, sulfonato de p-tolueno" refere-se a



5 A expressão "1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolin-4-il)-etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona" refere-se a



A expressão "3-(6-ciano-quinolin-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol" refere-se a



10 A expressão "quantidade eficaz" de um composto da presente invenção refere-se a uma quantidade, isto é, à dosagem que é eficaz no tratamento dos distúrbios aqui descritos.

Uma quantidade eficaz pode ser prontamente determinada pelo diagnosticador atendendo, tal como um hábil na arte, pelo uso de técnicas convencionais e pela observação dos resultados obtidos sob circunstâncias
15 análogas. Na determinação de uma quantidade eficaz, a dose de um composto

da presente invenção, um número de fatores são considerados pelo diagnosticador atendendo, incluindo mas não limitado: ao composto da presente invenção a ser administrado; à coadministração de outras terapias, se usadas; à espécie de mamífero; seu tamanho, idade e saúde geral; ao distúrbio específico envolvido; ao grau de envolvimento ou severidade do distúrbio; à resposta do paciente individual; ao modo de administração; às características de biodisponibilidade da preparação administrada; ao regime de dose selecionado; ao uso de outra medicação concomitante; e outras circunstâncias pertinentes.

Uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção é esperada ser suprida QD ou BID a 10 mg a 1 g de dose diária total, preferivelmente de 100 – 200 mg de dose uniforme preferida. Uma quantidade eficaz poderia também ser dosagem de uma vez por dia ou uma vez por semana, com formulações de liberação sustentada. Quantidades mais preferidas podem ser determinadas por uma pessoa hábil na arte.

Entende-se que TGF- β inclui tanto TGF- β 1 como TGF- β 2,

As condições “caracterizadas por atividade TGF- β aumentada” incluem aquelas em que a síntese de TGF- β é estimulada, de modo que TGF- β está presente em níveis aumentados ou em que a proteína latente de TGF- β é indesejavelmente ativada ou convertida em proteína TGF- β ativa ou em que os receptores de TGF- β são supra-regulados ou em que a proteína TGF- β apresenta aumentada ligação a células ou matriz extracelular no local da doença. Assim, num ou noutro caso “atividade aumentada” refere-se a qualquer condição em que a atividade biológica de TGF- β é indesejavelmente elevada, independente da causa.

Há diversos tipos de câncer, isto é, neoplasmas susceptíveis, em que TGF- β 1 produzido pelo tumor pode ser nocivo. Estes incluem câncer da próstata (p. ex. Steiner e Barrack (1992) Mol. Endocrinol 6:15-25), câncer colorretal (p. ex., Neurath et al. (2004) Immunity. 21:491-501), câncer da

mama (p. ex., Arteaga, et al. (1993) Cell Growth e Differ. 4: 193-201), câncer de pulmão de célula não-pequena (p. ex., Ready et al., (abril 2005) Semin Oncol. 32 (2 Supl 3): S35-41, câncer ovariano (p. ex., Dr. Gustavo C. Rodriguez, (março 2-7, 2001) 32a. Annual Meeting of the Society of
 5 Gynecologic Oncologists. Nashville, TN), câncer endometrial (p. ex., Dowdy et al, (fev 2005) Gynecol Oncol. 96 (2): 368 - 73), câncer testicular (p. ex., Morera et al., (1992) Endocrinology. 130: 831 - 836), osteossarcoma (p. ex., Kloen et al., (Agosto 1, 1994) Int J Cancer. 58(3): 440 - 5), e mieloma múltiplo (p. ex., Cook et al., (1999) Journal of Leukocyte Biology, Vol 66,
 10 Edição 6: 981 - 988). Vide também pedido de patente PCT WO 02/0948332,

Outra forma de realização da presente invenção é a forma de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado cristalino. Este composto foi caracterizado como descrito abaixo.

15 Difração em pó para raio-X

O padrão de difração em pó para raio-X do monoidrato cristalino foi obtido em um difractômetro de pó de raio-X D5000 Siemens, equipado com uma fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) e um detector Si(Li) de estado sólido Kevex, operando a 50 kV e 40 mA. Cada amostra foi varrida
 20 entre 3 e 40 em 2θ , com um tamanho de etapa de $0,02^\circ$ em 2θ e uma taxa de varredura de 9,0 segundos/etapa e com uma divergência de 1 mm e recebendo incisões e uma incisão de detector de 0,1 mm. O pó seco foi acondicionado em suporte de amostra de carga de topo rebaixado e uma superfície lisa foi obtida usando-se uma lâmina de vidro. O padrão de difração da forma de
 25 cristal de monoidrato, coletado em temperatura ambiente e em umidade relativa, foi ajustado com base no pico padrão NIST 675 a $8,85$ graus 2 -teta.

Ângulo (+/- 0,01 graus)	Espaçamento d
9,05	9,76
10,25	8,63
11,02	8,02
11,95	7,40
12,37	7,15
13,49	6,56
14,84	5,96
17,48	5,07
20,11	4,41
20,77	4,27
24,13	3,69
25,38	3,51
26,00	3,42
26,73	3,33
28,79	3,10
29,91	2,98
31,84	2,81

Assim, uma amostra apropriadamente preparada de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado pode ser caracterizada por padrão de difração de raio-X usando-se radiação CuK_α tendo picos de difração (valores 2-teta) como descrito na Tabela 1 e, em particular, tendo picos a 9,05 em combinação com um ou mais dos picos a 11,02, 11,95 e 14,84; e, mais particularmente, tendo um pico a 9,05; com uma tolerância para os ângulos de difração de 0,1 grau, mais preferivelmente 0,01 grau.

10 Espectroscopia ^{13}C NMR de Estado Sólido

Espectros de polarização cruzada ^{13}C / rotação de ângulo mágico (CP/MAS) NMR (NMR ou SSNMR de estado sólido) foram obtidos para o monoidrato cristalino, empregando-se um espectrômetro NMR Varian Unity Inova 400 MHz, operando em uma frequência de carbono de 100,573 MHz e equipado com um acessório de sólidos completo e uma sonda T3 Chemagnetics de 4,0 mm. Foram usadas polarização cruzada de amplitude em rampa (RAMP-CP) a 62 kHz e modulação de fase de dois pulsos (TPPM) desacoplando a 70 kHz. Os parâmetros de aquisição foram como segue:

largura de pulso de frequência de rádio protônica 90° 4,0 µs, tempo de contato de 2,0 ms, tempo de repetição de pulso 60 s, frequência MAS 10 kHz, largura espectral 50 kHz e tempo de aquisição de 50 ms. As deslocamentos químicos foram referenciadas ao grupo metila de hexametilbenzeno ($\delta = 17,3$ ppm) por substituição de amostra.

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

Assim, o 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado cristalino pode ser caracterizado pela ressonância magnética nuclear ^{13}C de estado sólido, tendo mudança química (ppm) de 108,8, 115,6, 122,6, e 171,0 (+/-0,2) ppm.

Em outra forma de realização esta invenção fornece um processo para preparar 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado compreendendo cristalizar 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol por um apropriado solvente contendo uma relação de solvente orgânico para água de 0 – 90% sob condições que produzam 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado.

O 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado pode ser preparado por cristalização sob condições controladas. Em particular, o monoidrato da presente invenção pode ser preparado por cristalização por um solvente aquoso. Um solvente adequado é um que tem uma relação de solvente orgânico para água de 0 – 90% de solvente orgânico. Preferida é uma relação de solvente orgânico para água entre 60:40 a 85:15, Mais preferido é uma relação de solvente orgânico para água de 75:25, Solventes orgânicos preferidos são acetonitrila, acetona, tetraidrofurano (THF), metil etil cetona,

sulfóxido de dimetila (DMSO), dimetil formamida (DMF), N,N-dimetil acetamida, e N-metil pirrolidinona. Na prática, foi constatado que a acetona é mais preferida. Após suspender 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol anidro, monoidratado ou parcialmente hidratado em um solvente adequado, a mistura é agitada a 20 a 100 °C, preferivelmente 60 °C. Para solventes de mais baixo ponto de ebulição, tais como acetonitrila, acetona, e metil etil cetona, o volume da solução resultante é reduzido, preferivelmente por destilação, a entre 35 – 70% do volume inicial, preferivelmente 50%. Para solventes de mais elevado ponto de ebulição, uma quantidade apropriada de água adicional pode necessitar ser adicionada para precipitar o produto. Durante a redução, cristais semente de monoidrato podem ser adicionados. Lentamente esfriar a solução a 0 – 5 °C, preferivelmente em dois estágios, em que a solução é primeiro esfriada a 20 – 25 °C durante 90 minutos, seguido por esfriamento a 0 – 5 °C durante 30 – 40 minutos. Manter a lama a 0 – 5 °C por mais 30 minutos a 25 horas, preferivelmente 2 – 3 horas. Filtrar a lama e enxaguar o produto, preferivelmente com água ou solvente orgânico aquoso. Secar o produto, preferivelmente a 45 °C.

Em outra forma de realização o 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado pode ser preparado retransformando-se em lama 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol em água ou DMSO aquoso.

O 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado pode ser preparado agitando-se em 10 volumes de 0 – 90% de solvente orgânico em água em temperatura ambiente por 1 – 2 horas, filtrando-se e secando-se a 35 – 45 °C, preferivelmente 45 °C sob vácuo. Em casos em que o solvente orgânico for usado, a mistura de reação pode ser diluída com água (2 – 5 vezes o volume

do solvente orgânico usado) para melhorar a recuperação.

O 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado cristalino pode ser preparado por uma variedade de procedimentos, alguns dos quais são ilustrados nos
 5 exemplos abaixo. Será reconhecido por uma pessoa hábil na arte que a ordem das etapas individuais a seguir pode ser variada para fornecer 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo [1,2-b]pirazol monoidratado:

Preparação 1:

10 Preparação de cristais semente de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado

Em um frasco equipado com agitador mecânico adicionar 3-(6-ciano-quinolin-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo [1,2-b]pirazol (500,2 g), carbonato de potássio (39,4 g) e DMSO (3,000 ml) para
 15 formar uma lama. Em um frasco separado, combinar 35% de peróxido de hidrogênio (154 ml) e água deionizada (250 ml). Adicionar a solução de peróxido de hidrogênio diluída à lama acima durante 30 a 45 minutos, de tal maneira que a temperatura de reação fique na faixa de 22 a 34 °C. Após término da adição, agitar a mistura de reação até a reação estar completa,
 20 como julgado por HPLC.

Preparar uma solução de sulfito de sódio (107,6 g) em água deionizada (4500 ml). Adicionar a mistura de reação lentamente à solução de sulfito de sódio para extinguir a solução de reação, mantendo a temperatura de 22 a 40 °C. Agitar a mistura de reação por 40 – 60 minutos e adicionar
 25 ácido HCl concentrado (37,5%) (450 ml). À solução resultante adicionar carvão vegetal ativado (56,4 g) e agitar por 10 – 15 minutos. Filtrar a solução através de terra diatomácea para remover o carvão vegetal ativado. Adicionar metanol (525 ml) ao filtrado e então adicionar hidróxido de sódio (1700 ml) durante 35 minutos. Agitar a lama resultante durante a noite e filtrar.

Suspender a torta úmida em uma solução de 66,75% de acetonitrila em água (10000 ml). Aquecer a mistura resultante ao refluxo (~77 a 81 °C) e agitar por 20 minutos. Esfriar a mistura a 40 °C e adicionar água deionizada (2500 ml) e então esfriar a 0 – 5 °C e agitar por 2 a 3 horas. Filtrar a lama, lavar a torta com água deionizada (500 ml). Secar a torta durante a noite a 40 °C em um forno de vácuo para fornecer 404,2 g do produto.

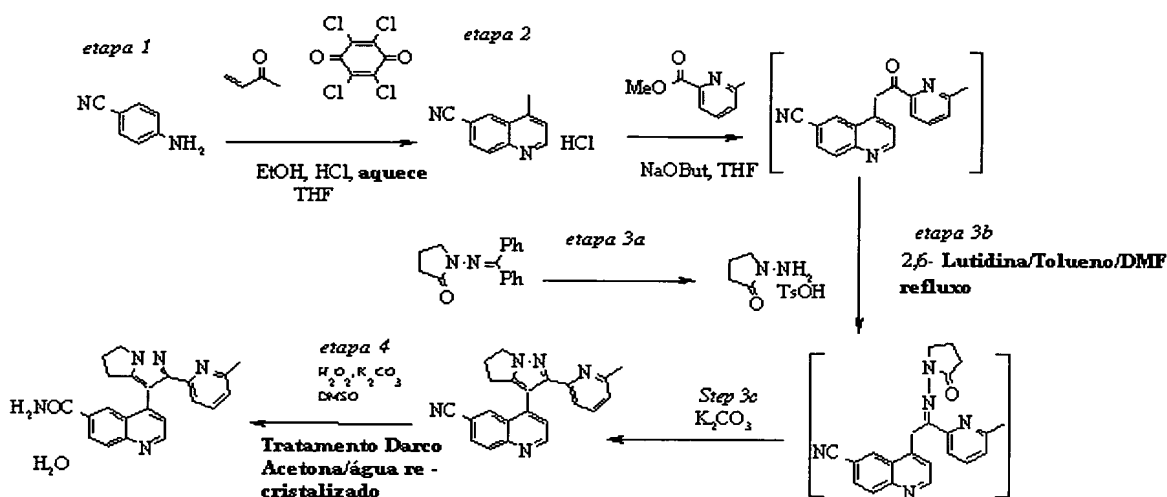
Preparação 2:

Preparação de cristais semente de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona

Em um frasco equipado com uma purga N₂ e agitação aérea, carregar cloridreto de 6-ciano-6-metil quinolino (10 g, 1 equiv) e THF (100 ml, 10 vol), em seguida esfriar a mistura a 20 – 25 °C. Adicionar NaOt-bu (15,497 g, 3,3 equiv) em porções durante 30 minutos para controlar a exoterma, mantendo-se a temperatura de ≤ 25 °C. Em seguida adicionar uma solução de metil-6-metil piridino-2-carboxilato (11,08 g, 1,5 equiv) in THF (20 ml, 2 vol) em gotas para manter a temperatura entre 20 °C e 25 °C. Monitorar o término da reação por análise HPLC (~2 h). Uma vez completa, esfriar a mistura a abaixo de 15 °C e adicionar 1N HCl (70 ml). Ajustar o pH a 8,0 – 9,0 com 5N NaOH (pH final a 8,8). Adicionar EtOAc (70 ml) e separar a camada aquosa e lavar a camada orgânica com cloreto de sódio aquoso saturado (35 ml) e bicarbonato saturado (35 ml). Concentrar a camada orgânica in vacuo a ~5 vol e lentamente adicionar MeOH (10 vol), em seguida destilar 10 vol e adicionar de volta MeOH (10 vol). Esfriar a mistura a 5 °C, filtrar e enxaguar a torta com MeOH (5 vol), então secar a torta in vacuo a 40 °C para fornecer 11,5 g do produto.

Exemplo 1:

Preparação de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado



Etapa 1: Preparação de 6-ciano-4-metil-quinolino cloridreto

Adicionar 95% de etanol (EtOH) (270 l, 9 vol.), 4-aminobenzonitrila (30,0 kg, 1 equiv) e 2,3,5,6-tetracloro-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona, (66,81 kg 1,07 equiv) em um vaso de reação de 760 litros, equipado com purga de nitrogênio, condensador, termopar e agitação aérea. A agitar por 2 – 5 min, em seguida adicionar ácido clorídrico concentrado (HCl) (62,56 l, 3,0 equiv.), em seguida aquecer a 75 °C. Diluir metil vinilcetona (33,06 l, 1,5 equiv.) em 95% EtOH (30 l, 1 vol.), em seguida adicionar lentamente à mistura de reação durante 30 min. Monitorar quanto ao término da reação por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC). Adicionar tetraidrofurano (THF) (11 VOL., 330 L) a 75 °C, em seguida agitar por 1 hora a 60 °C. Esfriar à temperatura ambiente e agitar por mais 1 hora. Filtrar em filtro/secador agitados, em seguida enxaguar com THF (240 l, 8 volumes). Secar durante a noite sob vácuo a 70 °C para fornecer o composto título (42,9 kg, 82,55%).

^1H NMR (DMSO d_6): δ = 9,047 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 8,865 ppm (d, 1,6 Hz, 1H); 8,262 ppm (d, 8,8 Hz, 1H); 8,170 ppm (dd, 2,2 Hz, 8,8 Hz, 1H); 7,716 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 2,824 ppm (s, 3H). MS ES+: 169,1; Exat: 168,07.

Etapa 2: Preparação de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona.

Combinar a 6-ciano-4-metil-quinolina (28 kg) e THF (9,5

vol.) e esfriar a 5 °C. Adicionar t-butoxido de sódio sólido (3,3 equiv.) em porções à lama esfriada, para manter a temperatura da batelada \leq 25 °C. Agitar a mistura resultante a 20 °C por 30 min. Separar um vaso, carregar com ácido 6-metil-2-piridinocarboxílico líquido, metil éster (1,5 equiv.) e diluir com THF (2,0 vols.). A solução de ácido 6-metil-2-piridinocarboxílico, metil éster é lentamente adicionada (20-40 min) enquanto mantendo uma temperatura de $<$ 25 °C. Agitar a mistura de reação por 2 horas a 20 °C e monitorar por HPLC/TLC (cromatografia de camada delgada sobre gel de sílica) para confirmar o término da reação. Em um vaso separado, diluir 1,03 kg de HCl conc. por kg de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona com 7,7 vol de água. Esfriar tanto a mistura de reação como a solução de HCl a 5 °C. Realizar um ajuste de pH na mistura de reação pela lenta adição da solução ácida, mantendo a temperatura a $<$ 15 °C. Solução ácida é adicionada, até o pH da mistura ser 8,0 – 9,0. Após o ponto final de pH ser obtido, extrair a mistura com acetato de etila (7 vol.). Lavar a camada orgânica com uma solução de cloreto de sódio/bicarbonato de sódio aquosa [0,78 kg de cloreto de sódio por kg de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona e 0,20 kg de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) por kg de 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona em 6,6 vol.]. Destilar a camada orgânica a uma atmosfera para remover THF e etil acetato (EA) até 5 vol. de solução concentrada permanecer. Utilizando metanol (10 vol.) realizar uma troca de solvente para metanol, utilizando uma operação constante de adição/destilação, enquanto mantendo 5 vol. Adicionar metanol quente (MeOH) (10 vol. @ 60 °C). Esfriar a solução a 50 °C, em seguida adicionar cristais semente obtidos pela Preparação 2. Esfriar a mistura gradualmente a 5 °C, agitar por 1 hora e filtrar. Lavar a torta produto com metanol esfriado (5 vols. @ 5 °C) e secar sob vácuo a 40 °C, até uma especificação de perda na secagem (LOD) de $<$ 1% ser satisfeita. Fornecer o composto título (31,6 kg, 81%).

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

Etapa 3a: Preparação de 1-(amino)-2-pirrolidinona, p-tolueno sulfonato.

Combinar 1-[(difenilmetileno)amino]-2-pirrolidinona (35,36 g, 134 mmoles) com 15 volumes of tolueno (530 ml) em um frasco de reação de 1 l, adicionar 1 equiv. de água (2,43 g, 134,9 mmoles) e aquecer a 40 °C. Adicionar 1 equiv. de monoidrato de ácido p-toluenossulfônico (25,978 g, 133,8 mmoles). Monitorar a reação por TLC, em seguida esfriar a 20 – 25 °C. Filtrar a lama e enxaguar a torta de filtro com 3 volumes de tolueno (105 ml). Secar a um peso constante em um secador de vácuo a 50 °C para fornecer o composto título (36,14 g, 99,2 %).

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

Etapa 3b e 3c: Preparação de intermediários 1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolin-4-il)-etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona e 3-(6-ciano-quinolin-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b] pirazol.

Dentro de um frasco de 3 gargalos de 1 l, equipado com agitador mecânico, um condensador Dean-Stark, termopar e purga N₂, carregar 2-(6-ciano-quinolin-4-il)-1-(6-metil-piridin-2-il)-etanona (25 g, 1 equiv), 1-(amino)-2-pirrolidinona, p-tolueno sulfonato (27,3 g, 1 equiv), dimetilformamida (DMF) (150 ml, 6 vol), tolueno (250 ml, 10 vol) e 2,6-lutidina (26 ml, 1 vol). Aquecer a mistura ao refluxo e periodicamente remover água do coletor. Monitorar a reação por análise HPLC ou TLC (5% MeOH/cloreto de metileno, sílica). Após 4 horas, a maior parte da cetona é convertida em 1-[(6-metil-piridin-2-il)-2-(6-ciano-quinolin-4-il)-

etilidenoamino]-pirrolidin-2-ona como indicado por TLC.

Esfriar a mistura de reação a 50 a 55 °C e carregar carbonato de potássio (K_2CO_3) (20,42 g, 1,66 equiv) dentro da mistura de reação durante poucos minutos e aquecer a mistura de reação de volta até o refluxo.

- 5 Continuar a remover a água coletada no coletor e monitorar a reação por HPLC quanto ao desaparecimento de hidrazona. Após término da reação, destilar a maior parte do tolueno (destilado total é 350 ml) até a mistura de reação alcançar uma temperatura de 145 °C. Esfriar a mistura de reação a ~30°C e diluir com água (450 ml) e agitar por 1,5 h em temperatura ambiente
- 10 (TA). Filtrar o produto formado por filtração e enxaguar a torta com água 200 ml. Após 1 hora sob vácuo e então secado em um forno de vácuo a 70 °C a um peso consistente. O sólido secado pesava 28,5 g, 93,2% produção e a pureza por HPLC é de 97%. O produto é usado como é na etapa seguinte.

- 1H NMR ($CDCl_3$): δ = 9,018 ppm (d, 4,5 Hz, 1H); 8,233 ppm (d, 8,7 Hz, 1H);
- 15 8,198 ppm (dd, 0,5 Hz, 1,8 Hz, 1H); 7,808 ppm (dd, 1,8 Hz, 8,8 Hz, 1H); 7,483-7,444 ppm (m, 2H); 7,380 ppm (d, 7,9 Hz, 1H); 6,936 ppm (d, 7,6 Hz, 1H); 4,422 ppm (t, 7,2 Hz, 2H); 2,970-2897 ppm (m, 2H); 2,776 ppm (p, 7,2 Hz, 2H); 2,065 ppm (s, 3H). MS ES+: 352,4 Exat: 351,15. Etapa 4: Preparação de monoidrato de 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-(6-amido-quinolin-4-il)-5,6-
- 20 diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol.

- Transformar em lama 3-(6-ciano-quinolin-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol (25,515 kg) e carbonato de potássio (0,2 eq.) em 6 volumes of dimetil sulfóxido (DMSO). Adicionar solução de peróxido de hidrogênio diluída [35% peróxido de hidrogênio (1,25
- 25 eq.) a 0,5 volume de água purificada] à lama durante 2 – 3,3 h, enquanto mantendo a temperatura entre 20 – 38 °C. Monitorar a reação por HPLC (1 hora). Adicionar sulfito de sódio (0,6 eq.) a 9,1 volumes de água purificada. Adicionar a lama produto à solução de sulfito de sódio diluída [sulfito de sódio (0,6 eq.) em 9,1 volumes de água purificada], enquanto mantendo uma

temperatura de 20 – 39 °C, agitar esta lama por 1 – 2 horas para assegurar que todo o peróxido de hidrogênio remanescente seja completamente neutralizado. Verificar quanto a peróxido. Adicionar 1,08 v. de 32,1% HCl Grau Alimentar a esta lama e agitar por 20 – 30 min. Adicionar carvão vegetal ativado (10 % em peso) à solução e agitar por 20 – 40 minutos. Filtrar o produto bruto (a maior parte monoidrato), enxaguar a torta com água purificada. Adicionar 1,05 vol. de metanol ao filtrado. Adicionar 5,5 vol. de hidróxido de sódio 2N ao filtrado, enquanto mantendo uma temperatura de 20 – 30 °C. Agitar a lama por 20 – 30 min. Assegurar que o pH seja > 8.

- 10 Filtrar a lama e enxaguar a torta com água purificada. Suspende a torta úmida em 28 vol. de uma solução de 75%/25% de acetona/água purificada. Aquecer esta lama ao refluxo (60 °C) e agitar por 30 – 45 minutos após o produto dissolver-se. Filtrar a solução produto. Começar a destilação e adicionar semente moída quando a temperatura do pote alcançar 63 °C. Continuar destilando até o volume do destilado ser 50% do volume inicial. Esfriar a lama a 20 – 25 °C durante 90 minutos. Em seguida esfriar a lama a 0 – 5 °C durante 30 – 40 minutos. Agitar por 2 – 3 horas a 0 – 5 °C. Filtrar a lama e enxaguar a torta produto no filtro com água purificada. Secar o produto sob vácuo a 45 °C para fornecer o composto título (25,4 kg, 90%).
- 20 Teor de água por Karl Fischer de 4,6% em monoidrato. Teoria: 4,65%.
¹H NMR (CDCl₃): δ = 9,0 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 8,23-8,19 ppm (m, 2H); 8,315 ppm (dd, 1,9 Hz, 8,9 Hz, 1H); 7,455 ppm (d, 4,4 Hz, 1H); 7,364 ppm (t, 7,7 Hz, 1H); 7,086 ppm (d, 8,0 Hz, 1H); 6,969 ppm (d, 7,7 Hz, 1H); 6,022 ppm (m, 1H); 5,497 ppm (m, 1H); 4,419 ppm (t, 7,3 Hz, 2H); 2,999 ppm (m, 2H); 2,770 ppm (p, 7,2 Hz, 7,4 Hz, 2H); 2,306 ppm (s, 3H); 1,817 ppm (m, 2H). MS ES+: 370,2; Exat: 369,16.
- 25

Alternativamente, o monoidrato da presente invenção pode ser preparado por recristalização de 2-(6-Metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol.

Exemplo 2:

2-(6-Metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado

Suspender 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol em 28 vol. de uma solução de 75%/25% de acetona/água purificada. Aquecer esta lama ao refluxo (60 °C) e agitar por 30 – 45 minutos após o produto dissolver-se. Filtrar a solução produto. Iniciar a destilação e adicionar semente moída quando a temperatura do pote alcançar 63 °C. Continuar destilando até o volume do destilado ser de 50% do volume inicial. Esfriar a lama a 20 – 25 °C durante 90 minutos. Em seguida esfriar a lama a 0 – 5 °C durante 30 – 40 minutos. Agitar por 2 – 3 horas a 0 - 5 °C. Filtrar a lama e enxaguar o a torta produto no filtro com água purificada. Secar o produto sob vácuo a 45 °C para fornecer o composto título. A produção de reação é de > 80%. A pureza do produto é > 98% com baixas substâncias totais relacionadas.

Alternativamente, o monoidrato da presente invenção pode ser preparado retransformando-se em lama 2-(6-Metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol.

Exemplo 3:

2-(6-Metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado

Preparar 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolol[1,2-b]pirazol monoidratado por agitação do composto ou ingrediente farmacêuticamente ativo (API) em 10 volumes de água em temperatura ambiente por 1 – 2 horas, filtrar e secar a 45 °C sob vácuo.

PURIFICAÇÃO DE RECEPTOR I DE TGF- β 1 E REAÇÕES DE CINASE IN VITRO

Para Receptores de TGF- β 1 Tipo I (RIT204D):

O domínio da cinase citoplásmica rotulada 6X-HIS de cada

receptor foi expresso e purificado de lisados de células de inseto Sf9, como resumidamente descrito abaixo:

Os lisados de célula foram clarificados por centrifugação e filtrados 0,45 μ M antes da purificação por cromatografia de afinidade Ni/NTA (Qiagen).

Protocolo de Cromatografia:

Equilibrar com 10 CV de LB, carregar a amostra, lavar com tampão 10 CV RIPA (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 0,25 % de deoxicolato de sódio, adicionar 20 mM de β -mercaptoetanol fresco, 1 mM PMSF), lavar com 10 CV LB, lavar com 10 CV 1X KB (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM NaF, 2 mM de β -mercaptoetanol), eluir com um gradiente linear de 1X KB contendo 200 mM Imidazol.

Ambas as enzimas eram aproximadamente 90% puras e tinham atividade de autofosforilação.

Reações: 170 – 200 nm enzima em 1X KB, séries de diluição composto em 1X KB/16% DMSO (20 μ M a 1 nM concentração final com 4% DMSO concentração final), as reações são iniciadas pela adição de mistura ATP (concentrações finais 4 μ M ATP/1 μ Ci ^{33}P - α -ATP) em 1X KB.

As reações são incubadas a 30 °C por 1 hora. As reações são paradas e quantificadas usando-se precipitação TCA/BSA padrão em placas de filtro de fibra de vidro Millipore FB e por contagem de cintilação líquida em um MicroBeta JET.

O composto aqui descrito inibe o domínio de cinase do receptor TGF- β 1 Tipo I (RIT204D) com um valor IC_{50} de 56 nM.

Os compostos da presente invenção são preferivelmente formulados como composições farmacêuticas administradas por uma variedade de vias. Muitíssimo preferivelmente, tais composições são para administração oral. Tais composições farmacêuticas e processos para prepará-

las são bem conhecidos na arte. Vide, p. ex., REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, et al., ed., 19a. ed., Mack Publishing Co., 1995).

Os compostos da presente invenção são geralmente eficazes em uma larga faixa de dosagem. Por exemplo, dosagens por dia normalmente situam-se dentro da faixa de cerca de 0,0001 a cerca de 30 mg/kg de peso corporal. Em alguns exemplos, os níveis de dosagem abaixo do limite inferior da faixa supracitada podem ser mais do que adequados, enquanto em outros casos dosagens ainda maiores podem ser empregadas sem provocar qualquer efeito colateral nocivo e, portanto, a faixa de dosagem acima não é destinada a limitar o escopo da invenção de forma alguma. Deve ser entendido que a quantidade do composto realmente administrada será determinada por um médico, à luz das circunstâncias pertinentes, incluindo a condição a ser tratada, a via escolhida de administração, o composto ou compostos reais administrados, a idade, peso e resposta do paciente individual e a severidade dos sintomas do paciente.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de ser 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado.

5 2. Composto sendo 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol cristalino monoidratado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o padrão de difração em pó para raio-X (radiação Cu, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) compreende um pico a 9,05 e um ou mais picos selecionados do grupo compreendendo 11,02,
10 11,95 e 14,84 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

 3. Composto sendo 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol cristalino monoidratado, compreendendo o 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado como definido na reivindicação
15 1, caracterizado pelo fato que o padrão de difração em pó para raio-X (radiação Cu, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) compreende um pico a 9,05 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

 4. Composto sendo 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda pelo fato de a ressonância
20 magnética nuclear ^{13}C de estado sólido ter um deslocamento químico (ppm) de 108,8, 115,6, 122,6 e 171,0 ($\pm 0,2$) ppm.

 5. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender qualquer um dos compostos como definidos nas reivindicações 1 – 4 e um excipiente, diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

25 6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para uso em terapia.

 7. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de condições que resultam de produção de

TGF- β excessiva em um mamífero.

8. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer da próstata, câncer colorretal, câncer da mama, câncer de pulmão de célula não-pequena, câncer ovariano, câncer endometrial, câncer testicular, osteossarcoma, e mieloma múltiplo.

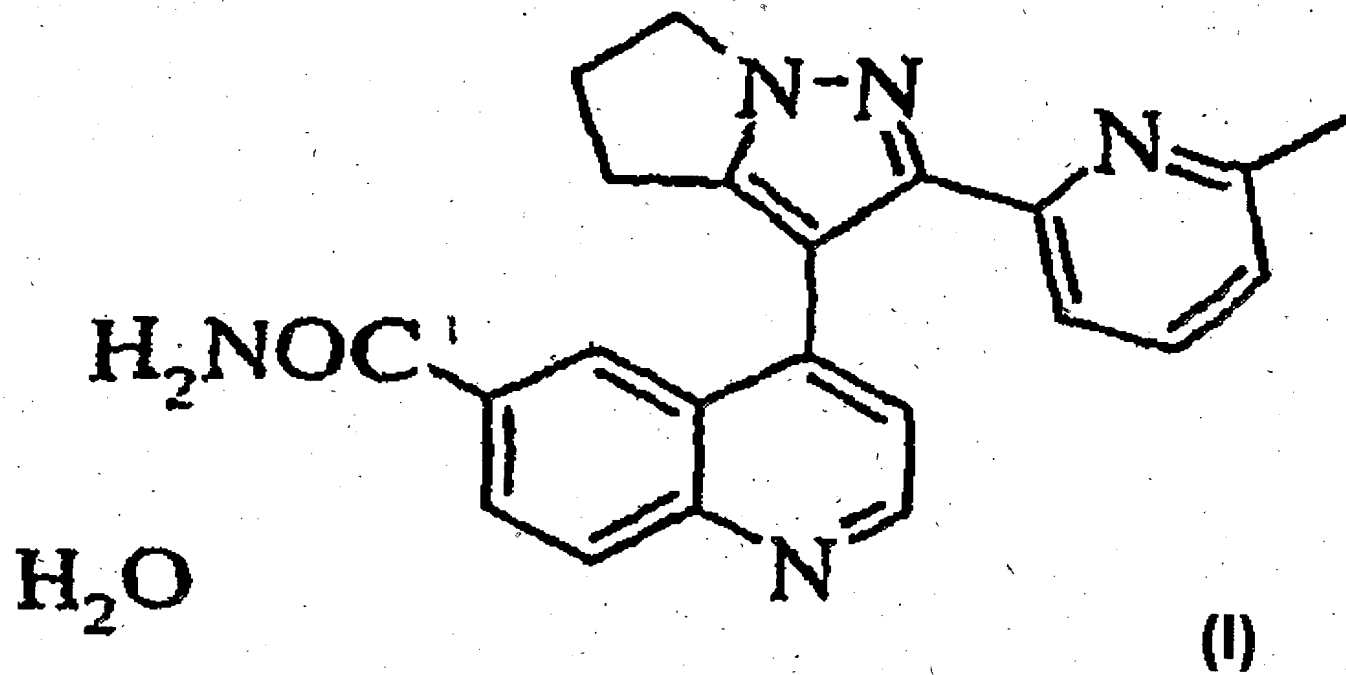
9. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de condições que resultam de produção de TGF- β excessiva em um mamífero.

10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento de câncer da próstata, câncer colorretal, câncer da mama, câncer de pulmão de célula não-pequena, câncer ovariano, câncer endometrial, câncer testicular, osteossarcoma, e mieloma múltiplo.

11. Processo para produzir um composto sendo 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado cristalino, dito processo caracterizado pelo fato de compreender as etapas de cristalizar a base livre anidra ou recrystalizar o (6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado por uma relação de cerca de 0 – 90% de solvente orgânico para água.

12. Processo para produzir um composto sendo 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol monoidratado cristalino, dito processo caracterizado pelo fato de compreender as etapas de retransformar em lama 2-(6-metil-piridin-2-il)-3-[6-amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol em 0 – 90% de solvente orgânico para água.

13. Composto, caracterizado pelo fato de ser 3-(6-ciano-quinolin-4-il)-2-(6-metil-piridin-2-il)-5,6-diidro-4H-pirrólo[1,2-b]pirazol.



RESUMO

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO COMPOSTO,
E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM COMPOSTO”

A presente invenção fornece 2-(6-metil-piridin-1-il)-3-[6-
5 amido-quinolin-4-il)-5,6-diidro-4Hpirrolo[1,2-b]pirazol monoidratado
cristalino.

