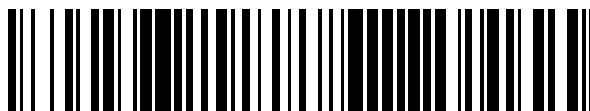


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 117**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2010 E 10717402 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2427449**

54 Título: **Compuestos de vinil indazolilo**

30 Prioridad:

07.05.2009 US 176290 P
04.02.2010 US 301416 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2013

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

CHEN, DAOHONG;
LI, HONG-YU y
ZHAO, GENSHI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 408 117 T3

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

DESCRIPCION

Compuestos de vinil indazolilo

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ha sido reconocido como un mediador importante de muchos procesos fisiológicos, tal como la morfogénesis durante el desarrollo y la angiogénesis. La familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) consiste en cuatro miembros (FGFR1-FGFR4), que son glucoproteínas compuestas por dominios de tipo inmunoglobulina (Ig) extracelular, una región de transmembrana hidrófoba y una parte citoplásmica que contiene un dominio tirosina quinasa. La unión de FGF conduce a la dimerización de FGFR, seguido de la autofosforilación del receptor y la activación de las vías de señal descendentes. La activación del receptor es suficiente para la reparación y activación de parejas de señal descendente específicas que participan en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento celular, metabolismo celular y supervivencia celular. En consecuencia, la vía de señal FGF/FGFR tiene efecto pleiotrópicos sobre muchos procesos biológicos críticos para la proliferación, migración, invasión y angiogénesis de células de tumores.

Los vinil indazoles son conocidos en la técnica para el tratamiento del cáncer. Véanse, por ejemplo, los Documentos WO 0210137 y WO 2003101968. Los inhibidores de FGFR son igualmente conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Documento WO 2002022598.

La presente invención proporciona nuevos compuestos de vinil indazolilo que se estima que tienen uso clínico para el tratamiento de trastornos proliferativos tal como el cáncer y particularmente en trastornos mediados de la desregulación del FGF y/o FGFR.

Además, ciertos compuestos de la presente invención tienen potencia FGFR1 y FGFR3 superior en comparación con ciertos inhibidores FGFR previamente conocidos.

La presente invención proporciona el compuesto (E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il) etanol o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

La presente invención proporciona igualmente el compuesto (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il) etanol o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.

La presente invención proporciona el compuesto (E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il) etanol, o unas sales aceptables farmacéuticamente del mismo, para uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer está seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tiroides, cáncer de célula renal, glioblastoma y cáncer testicular en un mamífero.

Esta invención proporciona igualmente composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto o sal de la presente invención en combinación con uno o más vehículos, diluyentes, o excipientes, aceptables farmacéuticamente. En una realización particular, la composición comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos.

Esta invención proporciona igualmente un compuesto o sal de la presente invención para uso en terapia. Adicionalmente, esta invención proporciona el uso de un compuesto o sal de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En particular, estos cánceres están seleccionados entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple AML, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tiroides, cáncer de célula renal, glioblastoma y cáncer testicular. Más particularmente, los cánceres están seleccionados entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tiroides, cáncer de célula renal, glioblastoma y cáncer testicular. Más particularmente todavía, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. Más particularmente todavía el cáncer es cáncer gástrico. Más particularmente todavía el cáncer es mieloma múltiple. Además, esta invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tiroides, cáncer de célula renal, glioblastoma y cáncer testicular que comprende un compuesto o sal de la presente invención como un ingrediente activo.

El técnico experto comprenderá que el (E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1N-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol racémico puede obtenerse esencialmente tal como se describe para el (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1N-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol a partir del 1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol racémico en lugar del (S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol. Adicionalmente, el técnico experto comprenderá que el (E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1N-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol contiene un centro quirál. Se prefiere que el (E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1N-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol exista en forma de un enantiómero individual. El enantiómero individual puede prepararse a partir de reactivos quirales o mediante técnicas de

síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Como alternativa, el enantiómero individual puede aislarse a partir de mezclas mediante técnicas de cristalización o de cromatografía quiral convencionales.

Se da por entendido para el lector experto que todos los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales. Los compuestos de la presente invención son aminas y, de acuerdo con ello, reaccionan con cualquiera de entre un cierto número de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido aceptables farmacéuticamente. Dichas sales de adición de ácido aceptables farmacéuticamente y la metodología común para su preparación son bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, P. Stahl, y otros, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCH/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, y otros, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, No. 1, January 1977).

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse tal como se ilustra en las preparaciones y ejemplos a continuación. La denominación de las preparaciones y ejemplos siguientes se ha realizado usando la representación de denominación Struct=Name en ChemDraw® Ultra 10.0.

Preparación 1

1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol

A un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 12 litros, se agregó tetrahidrofurano (THF, 3 litros) y diisopropilamina (DIPA, 315 ml, 2,24 mol) y se enfrió a -78 °C. Se agregó lentamente n-butil litio (1,6 M en hexanos, 1400 ml, 2,24 mol). Después de completar la adición y de fijar la temperatura a -78 °C, se agregó lentamente una solución de 3,5-dicloropiridina (296,7 g, 2,00 mol), lo cual formó inmediatamente una solución de color amarillo que cambió a una suspensión de color rojizo. Después de completar la adición y de fijar la temperatura a -78 °C, se agregó lentamente acetaldehído (230 ml, 4,05 mol) en THF (600 ml). La agitación se continuó a -78 °C. Después de 3 horas, se retiró el baño de hielo y se inició la interrupción de la reacción mediante la adición gota a gota de cloruro amónico acuoso saturado (1 litro). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante una noche con agitación. La mezcla se diluyó con metil terc-butil éter (MTBE, 2 litros), cloruro amónico acuoso saturado (1 litro) y agua (2 litros). Las capas se repartieron y los compuestos orgánicos se lavaron con cloruro sódico acuoso saturado (salmuera). La fase acuosa se extrajo con MTBE (1,5 litros). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice [acetato de etilo (EA) al 25 % en hexanos], proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un aceite de color rojo. Rendimiento: 352 g (90 %). MS (ES) m/z 192 [M+1]⁺.

Preparación 2

(S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol

La mezcla de diastereómeros obtenida en la reacción anterior se separó sobre una columna CHIRALPAK® AD-H, eluyéndose con heptanos al 90 %/etanol al 10 %. El enantiómero deseado es el pico 2. Con el fin de establecer la configuración absoluta, se disolvió una muestra del producto en CDCl₃ (concentración final 100 mg/ml). Los espectros de dicroísmo circular vibratorio (VCD) e infrarrojos (IR) se obtuvieron con una resolución de 4 cm⁻¹ usando un espectrómetro ChirallIR FT VCD (Bio Tools Inc®) con una célula de IR equipada con una ventana de BaF₂ y una longitud de paso de 100 mm. Los VCD e IR se recogieron durante 6 horas con 150 µl de la muestra. Los datos se presentaron sin modificarlos ni tratamiento de datos adicional. Las frecuencias de vibración y adsorción e intensidades de VCD se obtuvieron optimizando el conformador de energía más baja mediante un tratamiento gaussiano al nivel B3PW91/6-31G** en una agrupación Linux, y simulando los espectros correspondientes usando un ancho de banda de Lorentz con dicroísmo circular vibracional de 6 cm⁻¹. El análisis anterior mostró que el producto era el isómero S. Rendimiento: 84,37 g (27 %). MS (ES) m/z 192 [M+1]⁺.

Preparación 3

Metanosulfonato de (S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etilo

Se disolvió (S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol (5,02 g, 26,14 mmol) en diclorometano (DCM, 100 ml) y el matraz se enfrió en un baño de hielo. Se agregó trietilamina (TEA, 3,5 ml, 25,11 mmol) seguido de la adición gota a gota de cloruro de metanosulfonilo (2,2 ml, 28,42 mmol). Se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 4 horas, la reacción se interrumpió con agua (100 ml) y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con DCM (50 ml), seguido de alcohol isopropílico (IPA) al 20 %/cloroformo (50 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron en vacío. Rendimiento: 7,15 g (100 %). MS (ES) m/z 270 [M+1]⁺.

Preparación 4

4-yodo-1-(2-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)etil-H-pirazol

En un matraz de 3 bocas de 1 litro equipado con varilla de agitador magnético, atmósfera de nitrógeno y sonda de temperatura interna, se disolvió 2-(2-bromoetoxi)tetrahydro-2H-pirano (34 g, 156 mmol) en acetonitrilo (ACN, 400 ml).

Se agregó 4-yodopirazol (29,34 g, 149,74 mmol) seguido de carbonato de cesio (73,4 g, 223,02 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de CELITE®, la torta del filtro se lavó con ACN y el filtrado se concentró hasta un aceite de color oro. Se usó sin purificación adicional. Rendimiento: 47,819 g (99 %). MS (ES) m/z 323 [M+1]⁺.

5 Preparación 5

5-(terc-butildimetilsililoxi)-1H-indazol

Se cargó un recipiente de reacción de 10 litros con N,N-dimetilformamida (DMF, 2,50 litros), 5-hidroindazol (150,20 g, 1,12 mol) y 1H-indazol (114,35 g, 1,68 mol). La mezcla se enfrió a 0 °C y se agregó terc-butildimetilclorosilano (253,16 g, 1,68 mol) a lo largo de 0,5 horas. La mezcla se agitó a 18 °C durante 3 horas. Se agregó agua (2,5 litros) a la reacción lentamente con un baño de hielo a 5 °C para mantener una temperatura interna alrededor de 20 °C. La mezcla se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con EA (2 x 2,5 litros). Los extractos se combinaron y se lavaron con agua (3 x 2,5 litros) y salmuera. Las soluciones orgánicas se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se evaporaron hasta un aceite de color rojo. El aceite se pasó a través de un lecho de gel de sílice y se eluyó con eluyente (EA del 0 % al 30 % en hexano), proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un aceite de color naranja, el cual cristalizó. Rendimiento: 300 g (100 %). MS (ES) m/z 249 [M+1]⁺.

Preparación 6

5-(terc-butildimetilsililoxi)-3-yodo-1H-indazol

Se enfrió una solución de 5-(terc-butildimetilsililoxi)-1H-indazol (300,00 g, 1,21 mol) en DCM (4,00 litros) a 10 °C en un recipiente reactor encamisado de 10 litros. A la solución resultante se agregó N-yodosuccinimida (298,89 g, 1,33 mol) en porciones a lo largo de 0,5 horas. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas para proporcionar la conversión completa tal como se indicó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS) y cromatografía de capa fina (TLC). La mezcla se enfrió a 10 °C y se interrumpió con agua (2,5 litros). La mezcla se transfirió a un embudo de separación y la capa acuosa se extrajo en DCM (2,5 litros). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución de tiosulfato sódico acuoso al 10 % (5 litros) y salmuera. La solución orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró en vacío, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color naranja. Rendimiento: 388 g (90 %). MS (ES) m/z 375 [M+1]⁺.

Preparación 7

5-(terc-butildimetilsililoxi)-3-yodo-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol

Se enfrió una solución de 5-(terc-butildimetilsililoxi)-3-yodo-1H-indazol (387,00 g, 1,08 mol) en DCM (2,50 litros) y THF (1,00 litros) a 10 °C en un recipiente reactor encamisado de 10 litros. A la solución resultante se agregó ácido metanosulfónico (14,0 ml, 216,02 mmol), seguido de 3,4-dihidro-2H-pirano (296 ml, 3,24 mol) a lo largo de 0,5 horas, observándose una ligera exotermia. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se enfrió a 10 °C y se interrumpió con bicarbonato sódico acuoso saturado (2 litros). La mezcla se diluyó con agua (2 litros) y la capa acuosa se extrajo con DCM (2 litros). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 litros) y salmuera. La mezcla orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró en vacío. El residuo se eluyó a través de un lecho de gel de sílice con eluyente EA del 0 al 10 %/hexanos), proporcionando el compuesto del epígrafe. Rendimiento: 150 g (31 %). MS (ES) m/z 459 [M+1]⁺.

Preparación 8

(E)-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-3-(2-(1-(2-tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)etil-1H-pirazol-4-il)vinil)-1H-indazol-5-ol

Se roció con nitrógeno una mezcla de 5-(terc-butildimetilsililoxi)-3-yodo-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol (14 g, 30,54 mmol) en DMF (150 ml) en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 500 ml equipado con agitación magnética, sonda de temperatura, y condensador con cierre durante 10 minutos. A la solución resultante se agregó tributilamina (TBA, 6,7 g, 36,1 mmol) y 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (7,0 g, 43,18 mmol) y se continuó rociando durante 10 minutos. A la mezcla resultante se agregó cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (0,45 g, 0,63 mmol) y se continuó rociando durante un periodo adicional de 0,5 horas. La mezcla se calentó a 95-100 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió por debajo de 40 °C y se cargó con 4-yodo-1-(2-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)etil)-1H-pirazol (9,8 g, 30,42 mmol). A la mezcla resultante se agregó hidróxido de bario octahidrato (19,3 g, 60,3 mmol) y agua (13 ml) y se continuó rociando durante 10 minutos. A la reacción se agregó complejo en DCM de cloruro de 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno paladio(II) (1,3 g, 1,56 mmol) y se continuó rociando durante 0,5 horas. La mezcla se calentó a 95 °C bajo nitrógeno durante 3 horas. La mezcla se diluyó con EA y se filtró a través de un lecho de Celite®. El lecho se lavó con salmuera (400 ml) y las capas del filtrado se separaron. La capa orgánica se lavó con salmuera y las capas acuosas combinadas se extrajeron con EA. Las soluciones orgánicas se combinaron y se concentraron hasta un aceite de color pardo. El aceite se disolvió en DCM (100 ml) y se agregó a un lecho de gel de sílice. El lecho se eluyó con eluyente (EA al 50 % en hexanos seguido de EA al 70 % en hexanos), proporcionando

un aceite de color pardo claro. Este se trituró con MTBE (100 ml), proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido. Rendimiento: 5 g (37 %). MS (ES) m/z 439 [M+1]⁺.

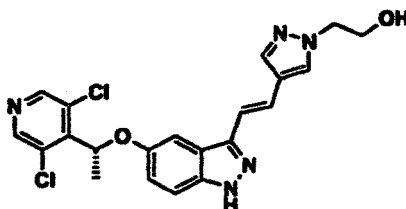
Preparación 9

5 S-((R)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-((E)-2-(1-(2-tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)etil-1H-pirazol-4-il)vinil-1H-indazol

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 250 ml equipado con una sonda de temperatura interna, condensador de reflujo, atmósfera de nitrógeno y varilla de agitación magnética, se formó una suspensión de (E)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-(2-(1-(2-tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)etil-1H-pirazol-4-il)vinil-1H-indazol-5-ol (10,0 g, 22,83 mmol) y carbonato de cesio (7,88 g, 23,94 mmol) en ACN (92 ml) y se calentó a 60 °C. A la suspensión se agregó metanosulfonato de (S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etilo (7,03 g, 26,02 mmol) y se agitó durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y los sólidos se lavaron con ACN. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (amoníaco 2M en metanol al 2-4 %/DCM). Las fracciones del producto se combinaron y se concentraron en vacío hasta una espuma de color blanco. Rendimiento: 12,5 g (86 %). MS (ES) m/z 612 [M+1]⁺.

15 Ejemplo 1

(R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol



Se cargó un matraz de fondo redondo de 3 bocas, de 250 ml, equipado con un embudo de adición, entrada de nitrógeno, sonda de temperatura interna y agitador magnético, con metanol (57 ml) y se enfrió en un baño de hielo. A la solución resultante, se agregó cloruro de acetilo (20 ml, 281,03 mmol) lentamente a través de un embudo de adición. A la solución, se agregó 5-((R)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-((E)-2-(1-(2-tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)etil-1H-pirazol-4-il)vinil-1H-indazol (7,1 g, 11,59 mmol) disuelto en metanol (40 ml) a través del embudo de adición. Una vez completada la adición, se retiró el baño de hielo, se calentó a temperatura ambiente y la mezcla se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró en vacío hasta una espuma de color amarillo. La espuma de color amarillo se disolvió en metanol (10 ml) y se agregó lentamente a una solución de bicarbonato sódico acuosa saturada (120 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se filtró, el sólido se lavó con agua (100 ml), y se secó bajo vacío. El sólido se recrystalizó a partir de EA/metanol/hexanos caliente, proporcionando el compuesto del epígrafe en forma de un sólido de color blanco. Rendimiento: 2,1 g (41 %). MS (ES) m/z 444 [M+1]⁺.

La regulación aberrante de la vía FGF/FGFR ha sido implicada en muchas formas de enfermedades malignas humanas. Los FGRs y FGFs están frecuentemente sobre-expresados en numerosos cánceres, y su expresión está frecuentemente relacionada con pobres prognosis. Se han encontrado mutaciones activantes en el dominio FGFR quinasa en diversos tipos de tumores, incluyendo mama, NSCLC, vejiga, gástrico, próstata, colon, y mieloma múltiple. Igualmente, se ha detectado la amplificación genómica del locus FGFR en muchos pacientes de cáncer de mama, gástrico, y mieloma múltiple. Así mismo, se ha encontrado sobre-expresión de FGFRs y FGFs en muchos tipos diferentes de tumores tales como cánceres de vejiga, mieloma múltiple, próstata, y pulmón. Otros cánceres que podrían beneficiarse de la terapia del inhibidor de la vía de la familia FGFR incluyen AML, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tiroides, cáncer pancreático, cáncer de célula renal, glioblastoma, y cáncer testicular. Además de sus papeles en la formación y progresión de tumores, los FGFs y FGFRs son igualmente reguladores clave de la angiogénesis, especialmente durante el crecimiento del tumor. El eje FGF/FGFR juega igualmente un papel importante en el aumento de otras células estromáticas de tumores tales como fibroblastos asociados con el cáncer. La sobre-regulación de los FGFs conduce igualmente a resistencia a anti-angiogénicos y otras quimio-terapias. Finalmente, los inhibidores de moléculas pequeñas de FGFRs han mostrado actividades anti-tumores en diversos modelos de tumores preclínicos y están siendo explorados en clínica. Considerada en su conjunto, la vía FGF/FGFR es esencial para diversos procesos celulares importantes en células de cáncer. Por estas razones, las terapias dirigidas a señales FGFRs y/o FGF pueden afectar tanto a las células del tumor directamente como a la angiogénesis del tumor.

Todos los compuestos ejemplificados han sido ensayados tal como se describe más adelante en al menos uno de los ensayos siguientes: Ensayo de Enzima FGFR1 (Unión al filtro), el Ensayo de Enzima FGFR3 (Unión al filtro), p-ERK inducido en FGF9 en el ensayo a base de célula RT-112 (en la presencia de BSA), la detección con AlphaScreen SureFire de fosforilación ERK (Thr202/Tyr204) en ensayos a base de células de Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC), FGFR en el ensayo de inhibición diana *in vivo*, y vejiga humana RT112 y otros modelos de xenoinjertos de cáncer. Estos ensayos demuestran que los compuestos ensayados son inhibidores de la vía de la familia FGFR y tienen actividad anti-cáncer.

Ensayo de Enzima FGFR1 y FGFR3 (Unión al filtro)

Se incubó FGFR1 o FGFR3 quinasa (0,15 ng/μl de FGFR1 humano ó 0,32 ng/μl de FGFR3 humano) en 50 μl de un tampón que contenía ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinoetanosulfónico (HEPES) 10 mM, pH 7,5, tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 8 mM, pH 7,5, ditiotreitól (DTT) 5,0 mM, trifosfato de adenosina (ATP) 10,0 μM, MnCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, TRITON® X-100 al 0,01 %, 0,5 μCi de ³³P-ATP, y 0,05 μg/μl de Poly(Glu-Tyr). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 μl a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, se interrumpió mediante la adición de 130 μl de H₃PO₄ al 10 %. La reacción (120 μl) se transfirió a una placa de filtro de fibra de vidrio de 1,0 μm de 96 pocillos, se incubó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y, a continuación, se lavó 3x sobre una TITERTEK® Zoom con H₃PO₄ al 0,5 %. Los pocillos se secaron al aire antes de la adición de 40 μl de MicroScint™ 20 (Packard) y, a continuación, se contaron sobre un contador Wallac Micobeta. Para el compuesto de inhibición, los compuestos se suministraron como soluciones madre 10 mM en dimetil sulfóxido (DMSO). Los compuestos se diluyeron en serie 1:3 en DMSO al 20 % para crear una curva de concentración-respuesta de 10 puntos y se diluyeron 1.5 (20 μM a 0,001 μM final en concentración en DMSO al 4 % final) dentro de la placa de reacción antes de la adición de la mezcla de reacción en la placa del filtro, a fin de determinar la actividad del compuesto. Los pocillos de control contenían DMSO al 4 % únicamente mientras que la línea basal establecida para los pocillos de control contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 M. Los valores de porcentaje de inhibición para cada una de las 10 concentraciones se calcularon a partir de los pocillos de control sobre cada placa y los datos de concentración-respuesta de 10 puntos se analizaron posteriormente usando el software ActivityBase (IDBS) que usa una ecuación logística de 4 parámetros y los valores IC₅₀ absolutos se estimaron a partir del ajuste de la curva resultante. Los ensayos de enzima FGFR1 y FGFR3 tienen Relaciones Significativas Mínimas (MSR) para el IC₅₀ estimado de 1,38 y 1,47, respectivamente. Los resultados de IC₅₀ para el Ejemplo 1 para FGFR1 y FGFR3 en estos ensayos se estimaron que eran de 0,0077 y 0,0064 μM, respectivamente. Estos datos demuestran que ciertos compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de la enzima FGFR1 y FGFR3.

p-ERK inducido en FGF9 con BSA

Se sembraron células de carcinoma de vejiga RT112 humana a una densidad de 5.000 células por pocillo en 100 μl de RPMI 1640 (Gibco 11875-085) suplementado con suero bovino fetal (FBS, Gibco 10082-147) al 10 % y 1 % de solución de penicilina/estreptomicina (Gibco 15140-122) en placas de 96 pocillos CELLBIND® (Corning 3340) y se incubaron durante una noche a 37 °C. A la mañana siguiente, se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó con 100 μl de RPMI 1460 suplementado con 20 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). Después de 3 horas de incubación a 37 °C, se agregaron a cada pocillo 20 μl de compuestos diluidos en serie 3x en RPMI 1640 con 20 mg/ml de BSA en DMSO al 6 %. Esto proporcionó una curva de dosis-respuesta de 10 puntos comprendida desde 10-0,005 μM en DMSO al 1 %. La incubación se continuó durante 1 hora a 37 °C. Las células se estimularon con 50 μl de una solución de 500 ng/ml de FGF9 (R&D Systems 273-F9) en RPMI libre de suero para proporcionar una concentración final de 500 ng/ml de FGF9. Las células se fijaron mediante la adición de 30 μl de una solución de formaldehído al 25 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (formaldehído al 3 % de concentración final), y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3x con PBS, seguido de la adición de 100 μl de metanol frío e incubación durante 30 minutos a -20 °C. El metanol se eliminó y las células se trataron con PBS conteniendo TRITON® X-100 (PBST) al 0,1 %, se lavaron 3x con PBS, y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron durante una noche a 4 °C con sacudidas suaves en 50 μl de una dilución 1:400 del anticuerpo primario p-p44/42 MAPK (Cell Signaling 9101 S) en PBS suplementado con BSA al 2 %, Cóctel 1 Inhibidor de Fosfatasa al 0,01 % (Sigma P2850), Cóctel 2 Inhibidor de Fosfatasa al 0,01 % (Sigma P5726) y Cóctel Inhibidor de Proteasa al 0,01 % (Sigma P8340). A la mañana siguiente, las placas se lavaron 2x con PBST y 2x con PBS, seguido de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad en 80 ul de una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario IgG H+L anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034) en PBS con BSA al 1 % y Cóctel 1 Inhibidor de Fosfatasa al 0,01 %, Cóctel 2 Inhibidor de Fosfatasa al 0,01 %, y Cóctel Inhibidor de Proteasa al 0,01 %. Las células se lavaron 3x con PBS, seguido de la adición de 100 μl de una dilución 1:200 de yoduro de propidio (PI) (Molecular Probe P-3566) en PBS y, a continuación, se incubaron en la oscuridad durante 1 hora. Las células positivas p-ERK y las células totales por pocillo se identificaron con el ACUMEN EXPLORER™ (TTP Lab Tech Ltd) usando el filtro óptico de 500-530 nM y 575-640 nM para Alexa 488 y PI, respectivamente. La intensidad media total por pERK/pocillo usando los valores Alexa 488 se convirtieron posteriormente en porcentaje de inhibición usando los valores obtenidos a partir de los controles MIN (compuestos de control positivo 10 μM en DMSO) y MAX (DMSO únicamente) ensayados sobre la misma placa. Los valores de porcentaje de inhibición y los datos de concentración-respuesta de 10 puntos se analizaron posteriormente usando una ecuación de dosis-respuesta sigmoide de 4 parámetros y los valores IC₅₀ relativos se estimaron a partir de la curva resultante. El ensayo p-ERK inducido en FGF9 con BSA tiene una Relación Significativa Mínima (MSR) para el IC₅₀ estimado de

2.7. El IC₅₀ para el Ejemplo 1 en este ensayo se estimó que era de 0,0004 µM. Estos datos demuestran que ciertos compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de la fosforilación de ERK inducida por FGF9 en células de cáncer humano.

5 Detección con AlphaScreen SureFire de fosforilación de ERK (Thr202/Tyr204) en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

10 El efecto de los compuestos sobre la inhibición del receptor 1 de FGF se midió monitorizando la fosforilación de ERK (pERK) en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento del fibroblasto básico (b-FGF) en células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC). Los niveles de pERK formado se midieron usando el sistema ALPHASCREEN® SUREFIRE® (TGR Biosciences, TGRES50K). Este es un formato de ensayo homogéneo que usa la captura inmu-

15 Las células HUVEC se recuperaron y mantuvieron en un medio de crecimiento consistente en un medio base de células endoteliales (Clonetics, CC-3132) suplementado con FBS al 10 %, extracto de cerebro bovino al 0,4 %, hidrocortisona al 0,1 %, sulfato de gentamicina amfotericina-BGA-1000 al 0,1 % y factor de crecimiento epidérmico al 0,1 %. Para el ensayo, las células se recolectaron mediante procedimientos convencionales y, a continuación, se contaron. Las células (20.000/pocillo) se sembraron en 100 µl de medio de crecimiento dentro de placas de 96 pocillos recubiertas con Poly-D-lisina (DB, 354640). Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C, 5 % de CO₂.

20 El día del ensayo, las células se mantuvieron en 100 µl de medio EBM (basal de células endoteliales) conteniendo FBS al 1,5 % y 20 mg/ml de BSA durante 3 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ y, a continuación, se trataron con 20 µl de 3x compuestos diluidos en serie en medio de mantenimiento durante 1 hora a 37 °C. Esto proporcionó una curva de concentración-respuesta de 10 puntos comprendida entre 10-0,005 µM en DMSO al 1 %. Después de 1 hora de compuesto de tratamiento, las células se estimularon con 50 µl de b-FGF (Sigma, F0291, concentración final de b-FGF de 50 ng/ml) a 37 °C durante 15 minutos. En los pocillos que contenían células y 50 µl de estimulador b-FGF se obtuvo la señal MAX, y las células con compuesto de control positivo 10 µM y 50 µl de estimulador b-FGF la señal MIN. A continuación, se retiró el medio y se agregaron 50 µl de 1x de tampón de lisis SUREFIRE® (componente SUREFIRE® Kit de TGR Biosciences) por pocillo y la incubación continuó a temperatura ambiente durante 10 minutos con sacudidas suaves. Para la detección de pERK, se transfirieron 6 µl de lisato y 10 µl de mezcla de reacción (60 partes de tampón de reacción/10 partes de tampón de activación/0,6 partes de cada una de las esféculas donantes y aceptoras, Perkin Elmer, 6760617R) a una proxiplaca de 384 pocillos (Perkin Elmer, 6006280). La placa se selló y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con sacudidas suaves y, a continuación, se leyó sobre un lector de placa Perkin Elmer EnVision equipado con un TurboModule usando fijaciones ALPHASCREEN® convencionales (Ex_{680nm} y Em_{520-620 nm}). Los datos de emisión se convirtieron en porcentaje de inhibición determinados a partir de los controles MAX (DMSO únicamente) y MIN (compuesto de control positivo 10 µM en DMSO) sobre cada placa y, a continuación, los datos de concentración de compuesto de 10 puntos se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando la ACTIVITYBASE® 4.0 y se estimó el IC₅₀. El ensayo de detección ALPHASCREEN® SUREFIRE® de fosforilación de ERK (Thr202/Tyr204) tiene una Relación Significativa Mínima (MSR) para el IC₅₀ de 2,1. El IC₅₀ para el Ejemplo 1 en este ensayo se estimó que era de 0,0006 µM. Estos datos demuestran que ciertos compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de la fosforilación de ERK inducida en b-FGF en células endoteliales umbilicales humanas.

Ensayo de inhibición diana de FGFR *in vivo*

45 Se aclimataron ratones desnudos hembra (CD1/nu/nu) durante 1 semana antes del tratamiento. Los animales se agruparon en grupos de tratamiento con control positivo, control negativo y compuesto. El compuesto (formulado en goma arábica al 10 %), control positivo (goma arábica al 10 %), y control negativo (goma arábica al 10 %) se administraron mediante sobrealimentación por sonda oral. Las dosis de compuesto estaban dentro del intervalo 0,15 a 25 mg/kg. Después de 2 horas, el grupo de tratamiento de compuesto y el grupo de control positivo se trataron con b-FGF de ratón recién preparado (6 µg/animal, Biosource PMG0033) de solución salina administrada intravenosamente. El grupo de control negativo se trató con solución salina administrada intravenosamente. Los ratones se sacrificaron 10 minutos post-dosis intravenosa. Se recogió el corazón del animal y se homogeneizó durante 10 segundos en 50 300 µl de tampón de lisis enfriado en hielo (RIPA; Boston BioProduct BP-115) conteniendo inhibidores diluidos 1:100 (cóctel I inhibidor de fosfatasa Sigma P2850; cóctel II inhibidor de fosfatasa Sigma P5726 y cóctel inhibidor de proteasa Sigma P8340). Los homogenatos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a una placa de 96 pocillos. El nivel de proteína se determinó mediante el procedimiento de ensayo de proteína COOMASSIE PLUS® (Pierce # 1856210). Los procedimientos de ensayo son los mismos que la recomendación del fabricante (véanse instrucciones en el folleto incluido en el kit de ensayo).

Los homogenatos de tejido de corazón se analizaron usando MSD® phospho-Erk ELISA (Meso Scale Discovery, número de catálogo N41CB-1) para determinar el nivel de fosfo-Erk en el tejido. Los procedimientos ELISA son los mismos que la recomendación del fabricante (véanse instrucciones en el folleto incluido en el kit de ensayo; la única modificación es que se agregó dodecil sulfato sódico al 0,2 % al tampón de lisis). El control positivo se usó como

inhibición fosfo-Erk mínima (0 %) y el control positivo se usó como control fosfo-Erk máxima (100 %). El porcentaje de inhibición de los grupos tratados con compuesto se calculó con relación a los grupos de inhibición máxima y mínima. El TEC_{90} se calculó a partir de un estudio de dosis-respuesta y es la concentración necesaria para lograr un 90 % de inhibición en ese punto de tiempo. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un TEC_{90} estimado de 28 nM. Este dato demuestra que ciertos compuestos de la presente invención son potentes inhibidores de la fosforilación de ERK inducida en b-FGF *in vivo*.

Para comprobar la actividad de este compuesto contra Kdr, se aclimataron y trataron ratones desnudos hembra (CD1/nu/nu) tal como se ha descrito anteriormente, excepto que se usó VEGF para inducir la autofosforilación de Kdr (VEGF (6 ng/animal, R % D Systems 493-MV/CF). Los tejidos del corazón se recolectaron y homogeneizaron tal como ha descrito anteriormente. Los homogenatos resultantes se analizaron usando MSD® phospho-Erk ELISA (Meso Scale Discovery, número de catálogo N41ZA-1) para determinar el nivel de fosfo-Erk en el tejido. Los procedimientos ELISA son los mismos que la recomendación del fabricante (véanse instrucciones en el folleto incluido en el kit de ensayo; la única modificación es que se agregó dodecil sulfato sódico al 0,2 % al tampón de lisis). El grupo de control positivo se trató con VEGF (96 ug/animal) en solución salina administrada intravenosamente (como inhibición de p-KDR mínima de 0 %). El grupo de control negativo se trató con solución salina administrada intravenosamente (como inhibición de p-KDR máxima de 100 %). El porcentaje de inhibición de los grupos tratados con compuesto se calculó con relación a los grupos de inhibición máxima y mínima. El TED_{50} se calculó a partir de un estudio de dosis-respuesta y es la dosis necesaria para lograr un 50 % de inhibición en ese punto de tiempo. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un TED_{50} estimado de 1,34 mg/kg. El TEC_{90} se calculó a partir de un estudio de dosis-respuesta y es la concentración necesaria para lograr un 90 % de inhibición en ese punto de tiempo. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 tiene un TEC_{90} estimado de 252 nM. Este dato demuestra que ciertos compuestos de la presente invención son inhibidores menos potentes de fosforilación de Kdr inducida en VEGF *in vivo* en comparación con ciertos inhibidores FGFR previamente conocidos.

Modelos de tumores de xenoinjertos

Células de cáncer de vejiga humana RT112 (European Collection of Cell Cultures), células de mieloma múltiple humano OPM-2 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL) NCI-H460 (American Type Culture Collection), células de cáncer pancreático humano BxPC-3 (American Type Culture Collection) o células de cáncer gástrico humano SNU-16 (American Type Culture Collection) se multiplicaron en cultivo, de acuerdo con las recomendaciones del KOREAN CELL LINE BANK (KCLB), se recolectaron y se inyectaron subcutáneamente sobre el flanco trasero de ratones desnudos. Cuando los tumores se establecieron (7-21 días después del implante), los animales se separaron aleatoriamente y se agruparon en los grupos de control y ensayo. El compuesto de ensayo se preparó en un vehículo apropiado (es decir, se formuló en goma arábiga al 10 %), y se administraron el compuesto de ensayo y un vehículo de control mediante sobrealimentación por sonda oral. La respuesta al tumor se determinó midiendo el volumen del tumor desarrollado dos veces a la semana durante el transcurso del tratamiento y se reportó como porcentaje de inhibición del volumen del tumor frente al grupo de control de vehículo. El compuesto del Ejemplo 1 demostró actividad anti-tumor dependiente de la dosis en diversos modelos de tumores de xenoinjertos. Por ejemplo, en el modelo de tumor de vejiga (RT-112), cuando se dosificó a 3 mg/kg (QD durante 21 días), se logró una inhibición del 41,3 %; cuando se dosificó a 3 mg/kg (BID durante 21 días), se logró una inhibición del 85,9 %. En el modelo de tumor gástrico (SNU-16), cuando se dosificó a 3 mg/kg (QD durante 17 días), se logró una inhibición del 62 %; cuando se dosificó a 3 mg/kg (BID durante 17 días), se logró una inhibición del 83 %. En el modelo de tumor de mieloma múltiple (OPM-2), cuando se dosificó a 3 mg/kg (QD durante 21 días), se logró una inhibición del 68 %; cuando se dosificó a 3 mg/kg (BID durante 21 días), se logró una inhibición del 84 %. En el modelo de tumor NSCLC (NCI-H460), cuando se dosificó a 3 mg/kg (QD durante 17 días), se logró una inhibición del 46 %; cuando se dosificó a 3 mg/kg (BID durante 17 días), se logró una inhibición del 69 %. En el modelo de tumor pancreático (BxPC-3), cuando se dosificó a 3 mg/kg (QD durante 21 días), se logró una inhibición del 1 %; cuando se dosificó a 3 mg/kg (BID durante 21 días), se logró una inhibición del 55 %. Estos datos demuestran que ciertos compuestos de la presente invención son inhibidores del crecimiento de tumores humanos de xenoinjertos en diversos modelos animales.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante una diversidad de vías. Lo más preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para la preparación de las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D. Troy, y otros, eds. 21st ed., Lipponcott Williams & Wilkins, 2005).

Los compuestos de la presente invención son eficaces de manera general dentro de un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones diarias entran normalmente dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, pueden dosificarse más que adecuadas proporciones de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado, aunque en otros casos pueden usarse dosis aún más grandes sin causar ningún efecto secundario perjudicial y, por tanto, el intervalo de dosificación anterior no está destinado a limitar de ninguna manera el ámbito de la invención. Se sobreentiende que la cantidad del compuesto realmente administrado estará determinada por un médico, a la vista de las circunstancias

relevantes, incluyendo el estado a tratar, la vía elegida de administración, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es (E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1 que es (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol, o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.
3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal de la reivindicación 1 ó 2 en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente.
4. Un compuesto o una sal de la reivindicación 1 ó 2 para uso en terapia.
5. Un compuesto o una sal de la reivindicación 1 ó 2 para uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 6. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
7. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es cáncer gástrico.
8. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cáncer es mieloma múltiple.