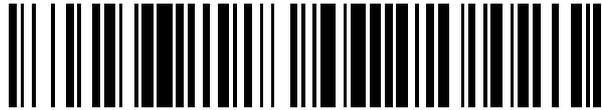


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 815**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/04** (2006.01)

**A61K 31/4427** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2010 E 10759927 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2493873**

54 Título: **2,6-dialquil-3,5-diciano-4-(1H-indazol-5-il)-1,4-dihidropiridinas fluoradas y procedimientos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**06.10.2009 EP 09172310**

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

**11.06.2014**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH  
(100.0%)  
Alfred-Nobel-Strasse 10  
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**MICHELS, MARTIN;  
FOLLMANN, MARKUS;  
VAKALOPOULOS, ALEXANDROS;  
ZIMMERMANN, KATJA;  
TEUSCH, NICOLE;  
LOBELL, MARIO y  
ENGEL, KAREN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 466 815 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

2,6-dialquil-3,5-diciano-4-(1H-indazol-5-il)-1,4-dihidropiridinas fluoradas y procedimientos de uso de las mismas

La presente invención se refiere a nuevos derivados de 2,6-dialquil-3,5-diciano-4-(1H-indazol-5-il)-1,4-dihidropiridina fluoradas que tienen actividad inhibidora de proteína tirosina quinasa, a un procedimiento para la fabricación de los mismos y al uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades medidas por c-Met o afecciones mediadas por c-Met, en particular cáncer y otros trastornos proliferativos.

El cáncer es una de las enfermedades más extendidas. Más de 4,4 millones de personas en todo el mundo recibieron un diagnóstico de cáncer de mama, de colon, de ovarios, de pulmones o de próstata en el año 2002 y más de 2,5 millones de personas murieron por estas devastadoras enfermedades (Informe de Globocan 2002, <http://www-dep.iarc.fr/globocan/down-loads.htm>). Solo en EE.UU., en 2005 se predijeron 1,25 millones de casos nuevos y 500.000 muertes por cáncer. La mayoría de estos nuevos casos se esperaba que fueran cánceres de colon (~100.000), de pulmón (~170.000), de mama (~210.000) y de próstata (~230.000). Se ha previsto que tanto la incidencia como la prevalencia del cáncer aumenten aproximadamente un 15% en los próximos diez años, lo que refleja un índice de crecimiento medio de 1,4 % (American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2005; [http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT\\_1x\\_Cancer\\_Facts\\_Figures\\_2007.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2007.asp)).

Existen muchos modos de aparición de cáncer, lo que es una de las razones por las cuales su terapia es difícil. Un modo es la transformación de las células por las oncoproteínas, que surgen a partir de las proteínas celulares normales mediante mutaciones genéticas, lo que tiene como resultado una activación no fisiológica de estas proteínas. Una familia de proteínas de las que deriva una serie de oncoproteínas son las tirosina quinasa (p. ej., la src quinasa) y, en particular, los receptores tirosina quinasa (RTK). En las últimas dos décadas, numerosas vías de investigación han demostrado la importancia de la señalización mediada por los receptores tirosina quinasa (RTK) en la regulación del crecimiento de células de mamífero. Recientemente se han conseguido resultados en la clínica con inhibidores selectivos de molécula pequeña de las tirosina quinasa como agentes antitumorígenicos.

El receptor c-Met también es un receptor tirosina quinasa. Su potencial oncogénico se identificó a principios de la década de 1980, cuando se aisló una Met mutada en una línea celular de osteosarcoma humano inducida químicamente que contenía el dominio quinasa del gen Met fusionado con un dominio de dimerización en su extremo N [C.S. Cooper et al., Nature 311: 29 - 33 (1984)].

La proteína Met celular es una proteína transmembrana heterodimérica sintetizada como una cadena sencilla de 190 kDa precursora [G.A. Rodrigues et al., Mol. Cell Biol. 11: 2962 - 70 (1991)]. El precursor se escinde intracelularmente después del residuo de aminoácido 307 para formar la cadena  $\alpha$  de 50 kDa y la cadena  $\beta$  de 145 kDa, que se conectan por puentes disulfuro. La cadena  $\alpha$  es completamente extracelular, mientras que la cadena  $\beta$  abarca la membrana plasmática. La cadena  $\beta$  está compuesta por un dominio sema N-terminal, que, junto con la cadena  $\alpha$  participa en la unión al ligando. El resto del ectodominio de la cadena  $\beta$  está compuesto por un dominio rico en cisteína y cuatro dominios de inmunoglobulina y es seguido por la región transmembrana y el dominio intracelular. El dominio intracelular contiene un dominio yuxtamembranal, el dominio quinasa y un dominio C-terminal, que participa en la señalización cadena abajo. Tras la unión al ligando se induce una dimerización del receptor y el dominio quinasa se activa mediante una cascada de etapas de autofosforilación de la tirosina en la región yuxtamembranal (Y1003), el bucle de activación de la quinasa (Y1234 e Y1235) y el dominio en el extremo carboxi (Y1349 e Y1356). Y1349 e Y1356 fosforilados comprenden el sitio de anclaje para múltiples sustratos para la unión a proteínas adaptadoras necesarias para la señalización de c-Met cadena abajo [C. Ponzetto et al., Cell 77: 261 - 71 (1994)]. Uno de los sustratos más cruciales para la señalización de c-Met es la proteína adaptadora del armazón Gab1, que se une a Y1349 o a Y1356 a través de un sitio de unión de la fosfotirosina inusual (denominado mbs: sitio de unión a met) que produce una única señal intracelular prolongada. Otro sustrato importante es la proteína adaptadora Grb2. Dependiendo del contexto celular, estos adaptadores participan en la activación de varias vías de señalización intracelular como las de señalización de ERK/MAPK, PI3K/Akt, Ras, JNK, STAT, NF $\kappa$ B y  $\beta$ -catenina.

c-Met está activada de forma única por el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión, y sus variantes de corte y empalme, que es su único ligando biológicamente activo conocido [L. Naldini et al., Oncogene 6: 501 - 4 (1991)]. El HGF tiene una estructura clara que revela similitudes con las proteinasas de la familia del plasminógeno. Está compuesto por un dominioamino terminal, seguido de cuatro dominios en rosquilla (kringle) y un dominio de homología con la serina proteasa, que no está enzimáticamente activo. De un modo similar a c-Met, el HGF se sintetiza como un precursor monocatenario inactivo (pro-HGF), que se escinde extracelularmente mediante las serina proteasas (p. ej., activadores de plasminógeno y factores de coagulación) y se convierten en un heterodímero activo de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas por disulfuro. El HGF se une a proteoglicanos de heparánulfato con una afinidad alta, que lo mantiene principalmente asociado con la matriz extracelular y limita su difusión. Los análisis de la estructura cristalina indican que el HGF forma un dímero que, tras la unión a c-Met, induce dimerización del receptor.

El HGF se expresa en las células mesenquimales y su unión a c-Met, que se expresa extensamente en concreto en las células epiteliales, tiene como resultado efectos pleiotrópicos en diversos tejidos, incluyendo las células epiteliales, endoteliales, neuronales y hematopoyéticas. Los efectos generalmente incluyen uno o todos de los

fenómenos siguientes: *i)* estimulación de la mitogénesis; se identificó el HGF por su actividad mitogénica sobre los hepatocitos; *ii)* estimulación de la invasión y migración en un abordaje experimental independiente, el HF se identificó como el factor de dispersión en base a su inducción de la motilidad celular (“dispersión”); y *iii)* estimulación de la morfogénesis (tubulogénesis). El HGF induce la formación de túbulos ramificados a partir de células renales caninas en una matriz de colágeno. Adicionalmente, pruebas procedentes de ratones genéticamente modificados y de experimentos en cultivos celulares indican que c-Met actúa como receptor de la supervivencia y protege a las células de la apoptosis [N. Tomita et al., *Circulation* 107: 1411 - 1417 (2003); S. Ding et al., *Blood* 101: 4816 - 4822 (2003); Q. Zeng et al., *J. Biol. Chem.* 277: 25203 - 25208 (2002); N. Horiguchi et al., *Oncogene* 21: 1791 - 1799 (2002); A. Bardelli et al., *Embo J.* 15: 6205 - 6212 (1996); P. Longati et al., *Cell Death Differ.* 3: 23 - 28 (1996); E.M. Rosen, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 47: 227 - 234 (1993)]. La ejecución coordinada de estos procesos biológicos por el HGF tiene como resultado un programa genético específico que se denomina “crecimiento invasivo”.

En condiciones normales, c-Met y HGF son esenciales para el desarrollo embrionario en ratones, en particular para el desarrollo de la placenta y el hígado y para la migración de mioblastos desde los somitas de las extremidades. La alteración genética de los genes de c-Met o HGF tiene como resultado fenotipos idénticos que muestran su interacción única. El papel fisiológico de c-Met/HGF en el organismo adulto se entiende menos, pero las pruebas experimentales sugieren que están implicados en la cicatrización de heridas, la regeneración tisular, la hematopoyesis y la homeostasis tisular.

La identificación de la oncoproteína TPR-MET fue una primera pista de que c-Met puede desempeñar un papel en la tumorigénesis. Pruebas sustanciales adicionales derivan de una serie de abordajes experimentales diferentes. La sobreexpresión de c-Met o de HGF en líneas celulares humanas y murinas induce tumorigenicidad y un fenotipo metastático cuando se expresan en ratones atímicos. La sobreexpresión transgénica de c-Met o de HGF induce tumorigénesis en ratones.

Es todavía más intrigante que se han identificado mutaciones de sentido erróneo de c-Met o las mutaciones que activan el receptor en carcinomas renales papilares esporádicos y hereditarios (HPRC), así como en otros tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, gástrico, de hígado, cabeza y cuello, ovárico y de cerebro. Significativamente, las mutaciones específicas en c-Met en las familias de HPRC se segregan con la enfermedad y forman un vínculo causal entre la activación de c-Met y el cáncer humano [L. Schmidt et al., *Nat. Genet.* 16: 68 - 73 (1997); B. Zbar et al., *Adv. Cancer Res.* 75: 163 - 201 (1998)]. Las mutaciones de activación con las actividades transformantes más fuertes se localizan en el bucle de activación (D1228N/H y Y1230H/D/C) y en el bucle P+1 adyacente (M1250T). Se han encontrado otras mutaciones más débiles cerca del bucle catalítico y dentro del lóbulo A del dominio quinasa. Adicionalmente, se han observado algunas mutaciones en el dominio yuxtamembranal de c-Met en tumores pulmonares que no activan directamente la quinasa, sino que, en su lugar, estabilizan la proteína convirtiéndola en resistente a la ubiquitinación y la posterior degradación [M. Kong-Beltran et al., *Cancer Res* 66: 283 - 9 (2006); T.E. Taher et al., *J. Immunol.* 169: 3793 - 800 (2002); P. Peschard et al., *Mol. Cell* 8: 995 - 1004 (2001)]. Es interesante el hecho de que las mutaciones somáticas de c-Met se asocian con una mayor agresividad y extensa metástasis en varios cánceres. Aunque la frecuencia de la línea germinal y las mutaciones somáticas es baja (inferior al 5%), se han observado otros mecanismos principales que conducen a la alteración de la regulación de la señalización de c-Met en ausencia de mutaciones, mediante mecanismos paracrinos o autocrinos. La activación paracrina se ha observado en tumores que derivan de células mesenquimales, como osteosarcomas o rhabdomyosarcomas, que producen fisiológicamente HGF, y en glioblastomas y carcinomas de mama que son de origen ectodérmico.

No obstante, los casos más frecuentes son carcinomas en los que c-Met se sobreexpresa como se observa en carcinomas de colon, páncreas, estómago, mama, próstata, ovarios e hígado. La sobreexpresión se puede producir mediante, por ejemplo, amplificación génica como se observa en las líneas celulares de tumores gástricos y pulmonares. Muy recientemente, la sobreexpresión de c-Met se detectó en líneas de células tumorales de pulmón que adquirieron resistencia a la inhibición del receptor de EGF [J.A. Engelmann et al., *Science* 316: 1039 - 1043 (2007)]. Algunos tumores epiteliales que sobreexpresan c-Met también coexpresan HGF, lo que tiene como resultado un bucle estimulador de c-Met/HGF autocrino y, de este modo, se sortea la necesidad de HGF derivado de células estromales.

En general, se ha encontrado que la activación aberrante de c-Met en el cáncer humano normalmente se asocia con un mal pronóstico, con independencia del mecanismo específico [J.G. Christensen et al., *Cancer Lett.* 225: 1 - 26 (2005)].

En resumen, se ha realizado un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo* que validan que c-Met es un importante objetivo del cáncer y se puede ver una lista exhaustiva en <http://www.vai.org/met> [C. Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 915 - 25 (2003)]. Se han seguido varias estrategias para atenuar la señalización aberrante de Met en tumores humanos, incluidos antagonistas del HGF e inhibidores de molécula pequeña, entre otros. Actualmente se encuentran en desarrollo clínico una serie de inhibidores de molécula pequeña, tales como ARQ-197 (Arqule), foretinib (XL-880, Exelixis/GSK), y PH-2341066 (Pfizer); recientemente se han revisado en [J.J. Cui, *Expert Opin. Ther. Patents* 17: 1035 - 45 (2007)].

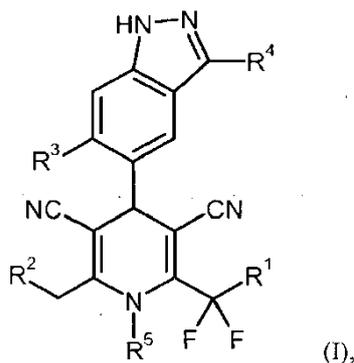
En el documento WO 2006/066011-A2 se han descrito derivados de 3-ciano-1,4-dihidropiridina sustituidos con haloalquilo con un grup arilo o heteroarilo en la posición 4 como moduladores tanto de los receptores esteroideos como de las actividades de los canales de calcio, siendo por tanto especialmente útiles para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer usando derivados de 4-fenil-1,4-dihidropiridina se ha reivindicado en el documento WO 2006/074419-A2.

En el documento WO 2008/071451-A1 se han divulgado recientemente 3-ciano-4-heteroaril-1,4-dihidropiridinas con varias sustituciones con actividad inhibidora de c-Met quinasa. No obstante, durante investigaciones adicionales de esta nueva clase estructural de inhibidores de c-Met se observó que los compuestos candidatos estaban con frecuencia comprometidos por una biodisponibilidad oral insatisfactoria que dio lugar a determinaciones del aclaramiento en sangre en ratas significativamente menores de lo esperado. Dado que la biodisponibilidad oral también depende de lo bien que un compuesto se absorbe y dado el perfil farmacocinético y fisicoquímico de estos compuestos, se postuló la hipótesis de que la solubilidad baja y/o una inadecuada permeabilidad en el tracto gastrointestinal podrían conducir a dichas limitaciones en la absorción.

El problema técnico a resolver de acuerdo con la presente invención puede verse en la identificación de compuestos alternativos con una potente actividad inhibidora de la c-Met quinasa, que revelaría un incremento de la solubilidad y/o la permeabilidad, lo que después conduce a un incremento de la fracción absorbida tras la administración peroral de estos compuestos.

Sorprendentemente, actualmente se ha hallado que determinados derivados de 3,5-diciano-4-(1*H*-indazol-5-il)-2,6-dialquil-1,4-dihidropiridina fluorados en los que uno de los grupos alquilo en la posición 2 y 6 representa específicamente un grupo difluorometilo o trifluorometilo exhiben propiedades de permeabilidad significativamente mejoradas *in vitro* según la evaluación mediante un ensayo celular intestinal bien establecido.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a derivados de 2,6-dialquil-3,5-diciano-4-(1*H*-indazol-5-il)-1,4-dihidropiridina fluorados de fórmula general (I)



en la que

R<sup>1</sup> es hidrógeno o flúor,

R<sup>2</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) opcionalmente sustituido con hasta cinco átomos de flúor,

R<sup>3</sup> es hidrógeno o flúor,

R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y

R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención también pueden estar presentes en forma de sus sales, hidratos y/o solvatos.

Las sales para la finalidad de la presente invención son, preferentemente, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de acuerdo con la invención (por ejemplo, véase S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1 - 19).

Los hidratos de los compuestos de la invención o sus sales son composiciones estequiométricas de los compuestos o sales con agua, tales como, por ejemplo, hemi, mono o dihidratos.

Los solvatos de los compuestos de la invención o sus sales son composiciones estequiométricas de los compuestos o sales con disolventes.

Alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) en el contexto de la presente invención representan un radical hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 5 y de 1 a 4 átomos de carbono, respectivamente. Se

prefiere un radical alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, 1-etilpropilo, *n*-pentilo y *neo*-pentilo.

- 5 Los compuestos de la presente invención pueden, por la naturaleza de los centros asimétricos o por rotación restringida, estar presentes en forma de isómeros (enantiómeros, diaestereómeros). Puede estar presente cualquier isómero en el que el centro asimétrico está en la configuración (*R*), (*S*), o (*R,S*).

También se apreciará que cuando están presentes dos o más centros asimétricos en los compuestos de la invención, a menudo serán posibles varios diaestereómeros y enantiómeros de las estructuras ilustradas y que los diaestereómeros puros y los enantiómeros puros representan realizaciones preferidas.

- 10 Todos los isómeros, separados, puros, parcialmente puros o en mezcla diaestereomérica o racémica, de los compuestos de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención. La purificación de dichos isómeros y la separación de dichas mezclas isoméricas se pueden conseguir mediante técnicas estándar conocidas en la materia. Por ejemplo, las mezclas diaestereoméricas se pueden separar en los isómeros individuales mediante procedimientos cromatográficos o cristalización, y los racematos se pueden separar en los respectivos enantiómeros bien mediante procedimientos cromatográficos sobre fases quirales o mediante resolución.
- 15

Además, todas las posibles formas tautoméricas de los compuestos descritos anteriormente están incluidas de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I), en la que

- $R^1$  es hidrógeno o flúor,
- 20  $R^2$  es alquilo ( $C_1$ - $C_4$ ) opcionalmente sustituido con hasta tres átomos de flúor,
- $R^3$  es hidrógeno o flúor,
- $R^4$  es hidrógeno, metilo o etilo, y
- $R^5$  es hidrógeno.

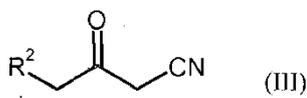
En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I), en la que

- 25  $R^1$  es hidrógeno o flúor,
- $R^2$  es metilo, etilo, 2,2,2-trifluoroetilo, propilo, 3,3,3-trifluoropropilo o 2-metilpropilo,
- $R^3$  es hidrógeno o flúor,
- $R^4$  es hidrógeno o metilo, \* y
- $R^5$  es hidrógeno.

- 30 En otra realización característica, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar los compuestos de fórmula general (I), caracterizado porque un aldehído indazolilo de fórmula (II)



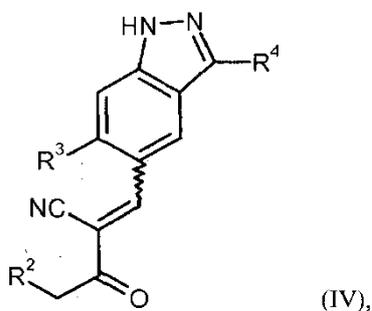
- 35 en la que  $R^3$  y  $R^4$  tienen los significados descritos anteriormente, se hace reaccionar con un cetónitrilo de fórmula (III)



o un enolato sódico del mismo, en la que  $R^2$  tiene el significado descrito anteriormente,

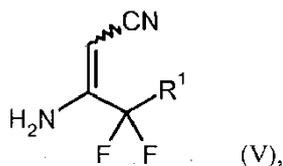
en presencia de un ácido, una combinación ácido/base y/o un agente deshidratante, dando un compuesto de fórmula (IV)

5



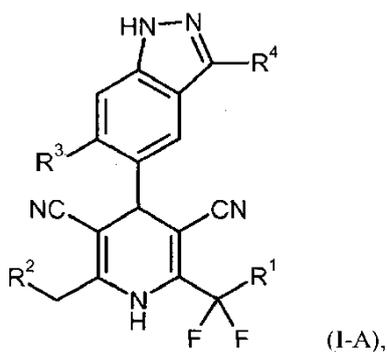
en la que  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  tienen los significados descritos anteriormente, y el último se condensa después con un enamionitrilo de fórmula (V)

10



en la que  $R^1$  tiene el significado descrito anteriormente, dando el compuesto de fórmula (I-A)

15



en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  tienen los significados descritos anteriormente, seguido opcionalmente por N-metilación de la dihidropiridina usando un compuesto de fórmula (VI)

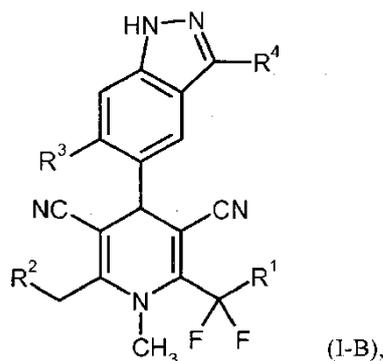
20



en la que

X representa un grupo saliente tal como halógeno, mesilato, triflato, tosilato o sulfato.

en presencia de una base, dando el compuesto de fórmula (I-B)



en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> tienen los significados descritos anteriormente,

- 5 y seguido opcionalmente, cuando sea adecuado, por (i) separación de los compuestos (I-A) y (I-B) en sus respectivos enantiómeros y/o diaestereómeros, usando preferentemente procedimientos cromatográficos y/o (ii) conversión de los compuestos (I-A) y (I-B) en sus respectivos hidratos o solvatos mediante tratamiento con los correspondientes disolvente.

La secuencia del procedimiento (II) + (III) → (IV), (IV) + (V) → (I-A) se puede llevar a cabo en dos etapas separadas, como se ha descrito anteriormente o usando un procedimiento en una etapa, es decir sin el aislamiento explícito del compuesto intermedio (IV); en algunos casos, en función de la reactividad de los reactantes individuales, también puede ser viable realizar una reacción de condensación de tres componentes/un matraz de los compuestos (II), (III) and (V) [para la síntesis de 1,4-dihidropiridinas en general, véase, por ejemplo, D.M. Stout, A.I. Meyers, Chem. Rev. 1982, 82, 223 - 243; H. Meier et al., Liebigs Ann. Chem. 1977, 1888; H. Meier et al., ibid. 1977, 1895; H. Meier et al., ibid. 1976, 1762; F. Bossert et al., Angew. Chem. 1981, 93, 755].

15 Las etapas del procedimiento (II) + (III) → (IV) and (IV) + (V) → (I-A) generalmente se llevan a cabo en un disolvente inerte a una temperatura que varía de +20° C al punto de ebullición del disolvente a presión atmosférica. Los disolventes adecuados para este fin son, por ejemplo, alcoholes tales como metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol, *tert*-butanol o *n*-pentanol, hidrocarburos tales como hexano, ciclohexano, benceno, tolueno o xileno, halohidrocarburos tales como diclorometano, triclorometano, tetraclorometano, tricloroetano, 1,2-dicloroetano, clorobenceno o clorotolueno, éteres tales como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano o 1,2-dimetoxietano u otros disolventes tales como acetonitrilo o ácido acético. También es viable usar mezclas de los disolventes. La reacción (II) + (III) → (IV) se realiza, preferentemente, en diclorometano, tolueno, etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol o *n*-pentanol a la respectiva temperatura de reflujo a presión atmosférica y la reacción (IV) + (V) → (I-A) se realiza, preferentemente, en etanol, *n*-propanol, isopropanol, *n*-butanol, *n*-pentanol, xileno o ácido acético también a la temperatura de reflujo a presión atmosférica.

La reacción (II) + (III) → (IV) puede tener lugar de forma ventajosa en presencia de un ácido, una combinación ácido/base y/o un agente deshidratante, tal como, por ejemplo, tamices moleculares. Ejemplos de ácidos adecuados son ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido metanosulfónico y ácido *p*-toluenosulfónico, bases adecuadas son, en particular, piperidina o piridina. Dependiendo de la reactividad de los componentes, a conversión (IV) + (V) → (I-A) se puede realizar sin reactivos auxiliares adicionales o se puede facilitar con catálisis ácida, preferentemente usando ácido acético.

Los disolventes inertes para la reacción de metilación (I-A) + (VI) → (I-B) son, por ejemplo, éteres tales como éter dietílico, *tert*-butil metil éter, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano o 1,2-dimetoxietano, hidrocarburos tales como benceno, tolueno, xileno, hexano o ciclohexano, halohidrocarburos tales como diclorometano, triclorometano, tetraclorometano, 1,2-dicloroetano, tricloroetano, tetracloroetano, clorobenceno o clorotolueno, u otros disolventes tales como acetonitrilo, *N,N*-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N'*-dimetilpropileno urea (DMPU), *N*-metilpirrolidinona (NMP) o piridina. También es viable usar mezclas de los disolventes. Preferentemente se usan diclorometano, tetrahidrofurano, *N,N*-dimetilformamida o mezclas de los mismos.

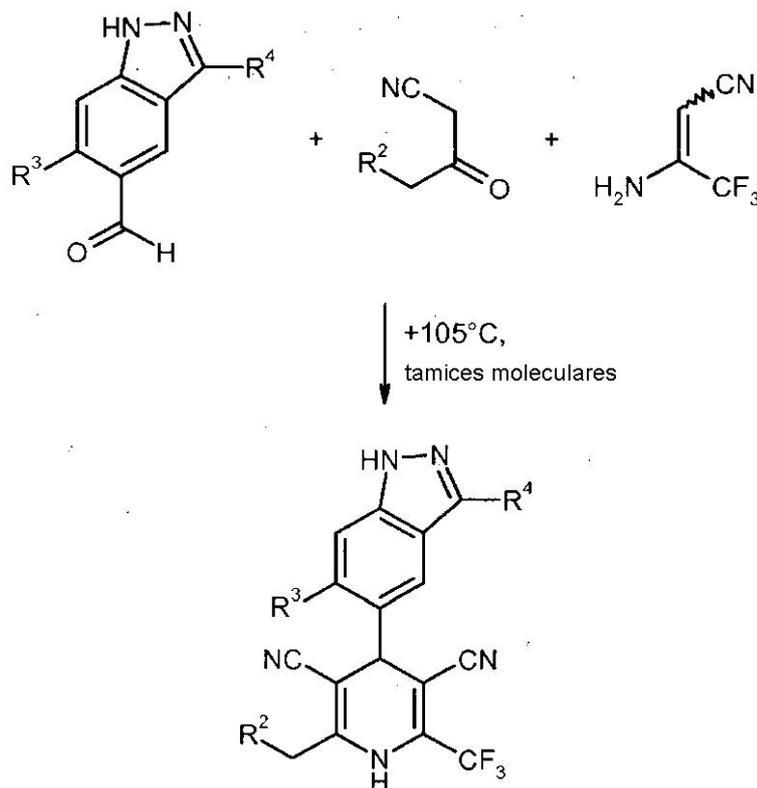
Bases adecuadas para la etapa del procedimiento (I-A) + (VI) → (I-B) son, en particular, carbonatos de metales alcalinos o de metales alcalino térreos tales como carbonato de litio, sódico, potásico, cálcico o de cesio, hidruros de metales alcalino tales como hidruros sódico o potásico, alcóxidos alcalinos impedidos estéricamente tales como *tert*-butóxido sódico o potásico, amidas alcalinas impedidas estéricamente tales como bis(trimetilsilil)amida de litio, de sodio o de potasio o diisopropilamida de litio, o aminas orgánicas tales como trietilamina, *N*-metilmorfolina, *N*-metilpiperidina, *N,N*-diisopropiletilamina o piridina. Preferentemente se usan carbonato potásico, carbonato de cesio o hidruro sódico.

La reacción (I-A) + (VI) → (I-B) generalmente se realiza a presión atmosférica a un intervalo de temperatura de -20° C a +100° C; preferentemente a 0° C a +50° C.

Los compuestos de las fórmulas (II), (III), (V) and (VI) están disponibles comercialmente, se conocen en la literatura o se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles mediante la adaptación de procedimientos estándar descritos en la literatura (para referencias adicionales, véase la sección experimental más adelante).

- 5 La preparación de los compuestos de la invención puede ilustrarse mediante el esquema de síntesis siguiente. Más adelante, en la sección experimental que describe los ejemplos, se presentan procedimientos más detallados.

**Esquema 1**



Procedimientos de uso

- 10 Los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes de la actividad o la expresión de los receptores tirosina quinasa, particularmente del receptor tirosina quinasa c-Met. Además, los compuestos de la invención se caracterizan por una elevada permeabilidad de las células epiteliales intestinales, lo que facilita la absorción de estos compuestos desde el tracto gastrointestinal después de la administración peroral. Por tanto, cabe esperar que los compuestos de fórmula (I) sean valiosos como agentes terapéuticos.

- 15 De acuerdo con esto, en otra realización, la presente invención proporciona compuestos para tratar trastornos relacionados o mediados por la actividad c-Met quinasa en un paciente que necesite dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones, los trastornos relacionados con la actividad c-Met quinasa son trastornos de proliferación celular, en particular cáncer.

- 20 Los términos "tratamiento" o "tratar", como se indica a lo largo del presente documento se usa de forma convencional, por ejemplo tratamiento o atención de un sujeto con el fin de combatir, aliviar, reducir, paliar, mejorar la afección de una enfermedad o trastorno, tal como un carcinoma.

- 25 El término "sujeto" o "paciente" incluye organismos que son capaces de sufrir un trastorno de la proliferación celular o que, de otro modo, se beneficiaría de la administración de un compuesto de la invención, tal como animales humanos y no humanos. Seres humanos preferidos incluyen pacientes humanos que sufren o son propensos a sufrir un trastorno de la proliferación celular o estado asociado, como se ha descrito en el presente documento. La expresión "animales no humanos" incluye vertebrados, por ejemplo mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, vacas, perros, gatos y roedores, por ejemplo ratones, y no mamíferos, tales como pollos, anfibios, reptiles etc.

- 5 La expresión “trastornos relacionados con o mediados por c-Met” deberá incluir enfermedades asociadas con la actividad de c-Met o que implican actividad de c-Met, por ejemplo la hiperactividad de c-Met, y afecciones que acompañan a estas enfermedades. Ejemplos de “trastornos relacionados con o mediados por c-Met” incluyen trastornos resultantes de la sobreestimulación de c-Met debido a una cantidad anormalmente alta de c-Met o mutaciones en c-Met, o trastornos resultantes de una cantidad anormalmente alta de la actividad de c-Met debido a una cantidad anormalmente alta de c-Met o mutaciones en c-Met.
- 10 La expresión “hiperactividad de c-Met” hace referencia a la expresión de c-Met en las células que normalmente no expresan c-Met o a la actividad de c-Met por las células que normalmente no poseen c-Met activo o al incremento de la expresión de c-Met, lo que conduce a la proliferación celular indeseada o a mutaciones que conducen a una activación constitutiva de c-Met. -
- 15 La expresión “trastorno de la proliferación celular” incluye trastornos que implican la proliferación indeseada o incontrolada de una célula. Los compuestos de la presente invención se pueden usar para prevenir, inhibir, bloquear, reducir, disminuir, controlar etc., la proliferación celular y/o la división celular y/o producir apoptosis. Este procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesite, incluyendo un mamífero, incluyendo un ser humano, una cantidad de un compuesto de la presente invención, o una sal, polimorfo, hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que es eficaz para tratar o prevenir el trastorno.
- 20 Los trastornos de la proliferación o hiperproliferación celular en el contexto de la presente invención incluyen, entre otros, por ejemplo, psoriasis, queloides y otras hiperplasias que afectan a la piel, trastornos esqueléticos, trastornos proliferativos angiogénicos o de los vasos sanguíneos, hipertensión pulmonar, trastornos fibróticos, trastornos proliferativos de células mesangiales, pólipos colónicos, enfermedad renal poliquística, hiperplasia prostática benigna (HPB) y tumores sólidos, tales como cánceres de mama, del tracto respiratorio, del cerebro, órganos reproductores, del tracto digestivo, del tracto urinario, del ojo, del hígado, de la piel, de cabeza y cuello, de tiroides, de paratiroides y sus metástasis distantes. Dichos trastornos también incluyen linfomas, sarcomas y leucemias.
- 25 Ejemplos de cáncer de mama incluyen, pero no se limitan a carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobular *in situ*.
- Ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero no están limitados a, carcinoma de pulmón de células pequeñas y carcinoma de pulmón amicrocítico, así como a adenoma bronquial y a blastoma pleuropulmonar.
- 30 Ejemplos de cánceres de cerebro incluyen, pero no se limitan a glioma del bulbo raquídeo y glioma hipotalámico, astrocitoma cerebelar y cerebral, glioblastoma, meduloblastoma, ependimoma, así como a tumor neuroectodérmico y a tumor pineal.
- Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, pero no se limitan a cáncer de próstata y cáncer testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, entre otros, cáncer de endometrio, cervical, de ovarios, vaginal y vulvar, así como el sarcoma del útero.
- 35 Los tumores del tracto digestivo incluyen, entre otros, cáncer anal, de colon, colorrectal, esofágico, de vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, de intestino delgado y de glándulas salivares.
- Los tumores del tracto urinario incluyen, entre otros, cáncer de vejiga urinaria, de pene, renal, de pelvis renal, de uréter, de uretra, y cánceres renales papilares hereditarios y esporádicos.
- Cánceres oculares incluyen, entre otros, melanoma intraocular y retinoblastoma.
- 40 Ejemplos de cánceres de hígado incluyen, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular (carcinomas de hepatocitos con y sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma del conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto.
- Los cánceres de piel incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel, y cáncer de piel no melanoma.
- 45 Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, entre otros, el cáncer de laringe/ hipofaringe / nasofaringe / orofaringe, y el cáncer de cavidad oral y labios, y cáncer de células escamosas.
- Los linfomas incluyen, entre otros, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central.
- Los sarcomas incluyen, entre otros, el sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, el histiocitoma fibroso maligno, el linfosarcoma y el rhabdomyosarcoma.
- 50 Las leucemias incluyen, entre otras, la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mielógena crónica y la leucemia de células pilosas.
- Los trastornos proliferativos fibróticos, es decir la formación anormal de matrices extracelulares, que se pueden

tratar con los compuestos de la presente invención incluyen fibrosis pulmonar, aterosclerosis, restenosis, cirrosis hepática y trastornos proliferativos de las células mesangiales, incluyendo enfermedades renales tales como glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefrosclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica, rechazo de transplantes y glomerulopatías.

5 Otras afecciones en seres humanos u otros mamíferos que se pueden tratar administrando un compuesto de la presente invención incluyen crecimiento tumoral, retinopatía, incluyendo retinopatía diabética, oclusión isquémica de la vena retiniana, retinopatía del prematuro y degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, psoriasis y trastornos ampollosos asociados con la formación de ampollas subepidérmicas, incluyendo penfigoide ampoloso, eritema multiforme y dermatitis herpetiforme.

10 Los compuestos de la presente invención también se pueden usar para prevenir y tratar enfermedades de las vías respiratorias y el pulmón, enfermedades del tracto gastrointestinal así como enfermedades de la vejiga urinaria y el conducto biliar.

Los trastornos mencionados anteriormente están bien caracterizados en seres humanos, pero también existen con una etiología similar en otros animales, incluyendo mamíferos, y se pueden tratar administrando las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

15 Los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar como único agente farmacéutico o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales en los que la combinación no produce efectos adversos inaceptables. Esta terapia de combinación incluye la administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula (I) y uno o más agentes terapéuticos adicionales, así como la administración del compuesto de fórmula (I) y cada agente terapéutico en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) y un agente terapéutico se pueden administrar al paciente conjuntamente en una composición de dosificación oral individual tal como un comprimido o cápsula, o cada agente se puede administrar en formulaciones de dosificación separada.

25 Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, un compuesto de fórmula (I) y uno o más agentes terapéuticos pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo (p. ej., de forma concurrente) o a tiempos separados escalonados (p. ej., secuencialmente).

En particular, los compuestos de la presente invención se puede usar en combinación fija o separada con otros agentes antitumorales tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antitumorales derivados de plantas, agentes hormonales de terapia, inhibidores de topoisomerasa, derivados de camptotecina, inhibidores de quinasa, fármacos objetivo, anticuerpos, interferones y/o modificadores de la respuesta biológica, compuestos antiangiogénicos y otros fármacos antitumorales. A este respecto, la siguiente es una relación no limitante de ejemplos de agentes secundarios que se pueden usar en combinación con los compuestos de la presente invención:

• los agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, N-óxido de mostaza de nitrógeno, ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, altretamina, apaziquona, brostalicina, bendamustina, carmustina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, mafosfamida, bendamustina y mitolactol; los compuestos alquilantes coordinados de platino incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, carboplatino, eptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, oxaliplatino y satraplatino;

• los anti-metabolitos incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ribósido de 6-mercaptopurina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo sólo o en combinación con leucovorina, tegafur, doxifluridina, carmofur, citarabina, octofosfato de citarabina, enocitabina, gemcitabina, fludarabina, 5-azacitidina, capecitabina, cladribina, clofarabina, decitabina, eflornitina, etinilcitudina, arabinósido de citosina, hidroxurea, melfalán, nelarabina, nolatrexed, ocfosfite, premetrexed disódico, pentostatina, pelitrexol, raltitrexed, triapina, trimetrexato, vidarabina, vincristina y vinorelbina;

• agentes de terapia hormonal incluyen, pero no se limitan a, exemestano, Lupron, anastrozol, doxercalciferol, fadrozol, formestano, inhibidores de la 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa 1, inhibidores de la 17-alfa hidroxilasa/17,20 liasa tales como acetato de abiraterona, inhibidores de la 5-alfa reductasa tales como finasterida y epristerida, anti-estrógenos tales como tamoxifeno citrato y fulvestrant, Trelstar, toremifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, letrozol, anti-andrógenos tales como bicalutamida, flutamida, mifepristona, nilutamida, Casodex, y agentes anti-progesterona y combinaciones de los mismos;

• las sustancias antitumorales derivadas de plantas incluyen, por ejemplo, las seleccionadas de inhibidores mitóticos, por ejemplo epotilonas tales como sagopilona, ixabepilona y epotilona B, vinblastina, vinflunina, docetaxel y paclitaxel;

• los agentes que inhiben la topoisomerasa citotóxica incluyen, pero no se limitan a, aclarrubicina, doxorubicina, amonafida, belotecán, camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, diflomotecán, irinotecán, topotecán, edotecarina, epimbicina, etopósido, exatecán, gimatecán, lurtotecán, mitoxantrona, pirambicina, pixantrona, rubitecán, sobuzoxano, taflupósido y combinaciones de los mismos;

- 5 • las sustancias inmunológicas incluyen interferones tales como interferón alfa, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón beta, interferón gamma-1a e interferón gamma-n1, y otros agentes potenciadores de la inmunidad tales como L19-IL2 y otros derivados de IL2, filgrastim, lentinán, sizofilán, TheraCys, ubenimex, aldesleucina, alemtuzumab, BAM-002, dacarbazina, daclizumab, denileucina, gemtuzumab, ozogamicina, ibritumomab, imiquimod, lenograstim, lentinán, vacuna de melanoma (Corixa), molgramostim, sargramostim, tasonermin, teceleucina, timalfasina, tositumomab, vimlizin, epratuzumab, mitumomab, oregovomab, pentumomab, y Provenge;
- 10 • los modificadores de la respuesta biológica son agentes que modifican los mecanismos de defensa de organismos vivos o las respuestas biológicas tales como la supervivencia, el crecimiento o la diferenciación de células de tejidos para dirigirlos para que tengan actividad antitumoral; tales agentes incluyen, por ejemplo, krestin, lentinán, sizofirán, picibanilo, ProMune y ubenimex;
- 15 • los compuestos antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, acitretina, aflibercept, angiostatina, aplidina, asentar, axitinib, bevacizumab, brivanib alaninat, cilengtida, combretastatina, endostatina, fenretinida, halofuginona, pazopanib, ranibizumab, rebimastat, recentina, regorafenib, removab, revlimid, sorafenib, esqualamina, sunitinib, telatinib, talidomida, ucraina, vatalanib y vitaxin;
- los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, rituximab, ticilimumab, ipilimumab, lumiliximab, catumaxomab, atacicept, oregovomab y alemtuzumab;
- los inhibidores de VEGF, tales como, por ejemplo, sorafenib, regorafenib, bevacizumab, sunitinib, recentin, axitinib, aflibercept, telatinib, brivanib alaninato, vatalanib, pazopanib y ranibizumab;
- 20 • inhibidores de EGFR (HER1) tales como, por ejemplo, cetuximab, panitumumab, vectibix, gefitinib, erlotinib y Zactima;
- inhibidores de HER2 tales como, por ejemplo, lapatinib, trastuzumab y pertuzumab;
- inhibidores de mTOR tales como, por ejemplo, temsirolimus, sirolimus/rapamicina y everolimus;
- inhibidores de c-Met;
- 25 • inhibidores de PI3K y AKT;
- inhibidores de CDK tales como roscovitina y flavopiridol;
- inhibidores de los puntos de control del ensamblaje del huso y agentes anti-mitóticos dirigidos tales como inhibidores de PLK, inhibidores de Aurora (p.ej., Hesperadina), inhibidores de la quinasa del punto de control e inhibidores de KSP;
- 30 • inhibidores de HDAC tales como, por ejemplo, panobinostat, vorinostat, MS275, belinostat y LBH589;
- inhibidores de HSP90 y HSP70;
- inhibidores de proteasoma tales como bortezomib y carfilzomib;
- inhibidores de la serina/treonina quinasa, incluidos inhibidores de MECK e inhibidores de Raf tales como sorafenib;
- 35 • inhibidores de farnesiltransferasa tales como, por ejemplo, tipifarnib;
- inhibidores de la tirosina quinasa, incluidos, por ejemplo, dasatinib, nilotibib, regorafenib, bosutinib, sorafenib, bevacizumab, sunitinib, cediranib, axitinib, aflibercept, telatinib, mesilato de imatinib, alaninato de brivanib, pazopanib, ranibizumab, vatalanib, cetuximab, panitumumab, vectibix, gefitinib, erlotinib, lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, e inhibidores de c-Kit;
- 40 • agonistas del receptor de vitamina D;
- inhibidores de proteína Bcl-2 tales como obatoclax, oblimersen sódico y gossypol;
- antagonistas del receptor CD 20 tales como, por ejemplo, rituximab;
- inhibidores de ribonucleótido reductasa tales como, por ejemplo, gemcitabina;
- agonistas de receptor 1 de ligando que inducen apoptosis y necrosis de tumores tales como, por ejemplo,

mapatumumab;

- antagonistas de receptor de 5-hidroxitriptamina tales como, por ejemplo, rEV598, xaliproden, clorhidrato de palonosetrón, granisetrón, Zindol y AB-1001;
- 5 • inhibidores de integrinas que incluyen inhibidores de integrina alfa5-beta1 tales como, por ejemplo, E7820, JSM 6425, volociximab y endostatina;
- antagonistas de receptor de andrógenos que incluyen, por ejemplo, decanoato de nandrolona, fluoximesterona, Android, Prost-aid, andromustina, bicalutamida, flutamida, apo-ciproterona, apo-flutamida, acetato de clormadiona, Androcur, Tabi, acetato de ciproterona y nilutamida;
- 10 • inhibidores de aromatasas tales como, por ejemplo, anastrozol, letrozol, testolactona, exemestano, aminoglutetimida y formestano;
- inhibición de la matriz metaloproteínasa;
- otros agentes anticancerosos que incluyen, por ejemplo, alitretinoína, ampligen, atrasentán, bexaroteno, bortezomib, bosentán, calcitriol, exisulind, fotemustina, ácido ibandronico, miltefosina, mitoxantrona, l-asparaginasa, procarbazona, dacarbazina, hidroxycarbamida, pegaspargasa, pentostatina, tazaroteno, velcade, 15 nitrato de galio, canfosfamida, darinaparsina y tretinoína.

En una forma de realización preferida, los compuestos de la presente invención se pueden usar en combinación con quimioterapia (es decir agentes citotóxicos), anti-hormonas y/o terapias dirigidas tales como otros inhibidores de quinasa (por ejemplo, inhibidores del EGFR), inhibidores de mTOR e inhibidores de la angiogénesis.

20 Los compuestos de la presente invención se pueden emplear también en el tratamiento del cáncer en conjunción con radioterapia y/o intervención quirúrgica.

Además, los compuestos de fórmula (I) pueden utilizarse, como tales o en composiciones, en investigaciones y diagnósticos, o como estándares de referencia analítica, y similares, que se conocen bien en la técnica.

#### Composiciones farmacéuticas y su uso

25 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica. El procedimiento incluye la etapa que comprende combinar al menos un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y pasar la combinación resultante en una forma de administración adecuada.

30 El componente activo de la fórmula (I) puede actuar sistémica y/o localmente. Para este fin, se puede aplicar de un modo adecuado, por ejemplo por vía oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, transdérmica, conjuntiva, ótica o como un implante o endoprótesis vascular.

Para estas vías de aplicación, el componente activo de fórmula (I) se puede administrar en formas de aplicación adecuadas.

35 La aplicación oral útil forma incluir las formas de aplicación que liberan el componente activo rápidamente y/o en forma modificada, tal como, por ejemplo, comprimidos (comprimidos no recubiertos y recubiertos, por ejemplo con un recubrimiento entérico), cápsulas, comprimidos recubiertos con azúcar, gránulos, microgránulos (pellets), polvos, emulsiones, suspensiones, soluciones y aerosoles.

40 La aplicación parenteral se puede llevar a cabo con evitación de una etapa de absorción (por vía intravenosa, intraarterial, intracardial, intraespinal o intralumbal) o con inclusión de una absorción (por vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea o intraperitoneal). Las formas de aplicación parenteral útiles incluyen preparaciones en inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados o polvos estériles.

45 Las formas adecuadas para otras vías de aplicación incluyen, por ejemplo formas farmacéuticas para inhalación (incluyendo, inhaladores en polvo, nebulizadores), gotas nasales, soluciones o pulverizaciones; comprimidos o cápsulas para administración lingual, sublingual o bucal, supositorios, preparaciones para oídos u ojos, cápsulas vaginales, suspensiones acuosas (lociones, mezclas para agitación), suspensiones lipófilas, ungüentos, cremas, leches, pastas, polvos para espolvoreado, implantes o endoprótesis vasculares.

50 En una realización preferida, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente se proporciona en una forma adecuada para administración oral. En otra realización

preferida, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente se proporciona en una forma adecuada para administración intravenosa.

El componente activo de fórmula (I) se puede convertir en las formas de aplicación citadas de un modo conocido *per se*. Esto se lleva a cabo usando excipientes no tóxicos inertes farmacéuticamente adecuados. Estos incluyen, entre otros, vehículos (por ejemplo, celulosa microcristalina), disolventes (por ejemplo, polietilenglicoles líquidos), emulsionantes (por ejemplo, dodecilsulfato sódico), agentes dispersantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona), biopolímeros sintéticos y naturales (por ejemplo, albúmina), estabilizantes (por ejemplo, antioxidantes tales como ácido ascórbico), colorantes (por ejemplo, pigmentos inorgánicos tales como óxidos de hierro) o correctores del gusto y/o el olor.

5 En otra realización, la invención proporciona compuestos para usar en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular en un paciente que necesite dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente. En determinadas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es cáncer.

15 Otro todavía aspecto más, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un trastorno de proliferación celular. En determinadas realizaciones, el trastorno de proliferación celular es cáncer.

20 Cuando los compuestos de la presente invención se administran como sustancias farmacéuticas a seres humanos y animales, se pueden administrar *per se* o como composición farmacéutica que contiene, por ejemplo de 0,1 a 99,5 % (más preferentemente, de 0,5 a 90%) del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

25 Los niveles de dosificación reales y el curso del tiempo de la administración de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente concreto, composición y modo de administración sin que sea tóxico para el paciente. Un intervalo de dosis de ejemplo es de 0,01 a 100 mg/kg al día o de 0,1 a 150 mg/kg al día.

30 En ciertas realizaciones, el compuesto de la invención se puede usar en terapia de combinación con quimioterapéuticos convencionales para el cáncer. Los regímenes terapéuticos convencionales para la leucemia y para otros tumores incluyen radiación, fármacos o una combinación de ambos.

35 La determinación de una cantidad antiproliferativa terapéuticamente eficaz o una cantidad antiproliferativa profilácticamente eficaz de los compuestos de la invención la puede realizar el médico o veterinario (el "clínico encargado de la atención"), como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Las dosis pueden variarse en función de los requisitos de los pacientes a juicio del clínico encargado de la atención; la gravedad de la afección que se esté tratando y el compuesto concreto que se esté empleando. Al determinar la cantidad o dosis antiproliferativa terapéuticamente eficaz y la cantidad o dosis antiproliferativa profilácticamente eficaz, el médico encargado de la atención considera 40 varios factores, que incluyen, entre otros: El trastorno de proliferación celular específico implicado; las características farmacodinámicas del agente concreto y su modo y vía de administración; el curso de tiempo deseado del tratamiento, la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado o afectación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; la pauta de dosis seleccionada; el tipo de tratamiento concurrente (es decir, la interacción del compuesto de la invención con otros agentes terapéuticos coadministrados) y otras circunstancias relevantes.

45 El tratamiento se puede iniciar con dosis más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se puede aumentar en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. Por comodidad, la dosificación diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día, si se desea. Se puede esperar que una cantidad antiproliferativa terapéuticamente eficaz y una cantidad antiproliferativa profilácticamente eficaz de un compuesto de la invención varíe desde aproximadamente 0,01 miligramos por kilogramo de peso corporal al día (mg/kg/día) a aproximadamente 100 mg/kg/día.

50 Una dosis preferida del compuesto de la invención para la presente invención es el máximo que un paciente puede tolerar sin desarrollar efectos secundarios graves. De forma ilustrativa, el compuesto de la presente invención se administra a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Los intervalos intermedios de los valores citados anteriormente también están destinados a ser parte de la invención.

Los porcentajes en las pruebas y ejemplos siguientes son, a menos que se indique lo contrario, porcentajes en peso; las partes son partes por peso. Las proporciones del disolvente, los índices de dilución y las concentraciones para las soluciones líquido/líquido se basan, en cada caso, en el volumen.

### A. Ejemplos

#### 5 Abreviaturas y acrónimos:

Ac	acetilo
ac.	acuoso (solución)
s-a	singlete ancho (RMN)
cat.	catalítico
10 conc.	concentrado
d	doblete (RMN)
DCI	ionización química directa (EM)
dd	doblete de dobletes (RMN)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
15 DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido-d <sub>6</sub>
ee	exceso enantiomérico
EI	ionización por impacto de electrones (EM)
equiv.	equivalente(s)
20 ESI	ionización por electropulverización (EM)
Et	etilo
CG/EM	espectroscopia de masas acoplada a cromatografía de gases
h	hora(s)
RMN de <sup>1</sup> H	espectrometría de resonancia magnética nuclear de protón
25 HOAc	ácido acético
HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento / de alta presión
CL-EM	espectroscopia de masas acoplada a cromatografía de líquidos
m	multiplete (RMN)
Me	metilo
30 min	minuto(s)
EM	espectrometría de masas
m/z	proporción masa-carga
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidin-2-ona
de t.	de la cantidad teórica (rendimiento químico)
35 c	cuartete (RMN)
quin	quinteto (RMN)
R <sub>f</sub>	factor de retención de TLC
FI	fase inversa (HPLC)
TA	temperatura ambiente
40 Tr	tiempo de retención (HPLC)
s	singlete (RMN)
sept:	septeto (RMN)
sext	sexteto (RMN)
TBAF	fluoruro de tetra- <i>n</i> -butilamonio
45 tBu	<i>tert</i> -butilo
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía en capa fina
t	triplete (RMN)
50 v/v	proporción volumen/volumen
p/v	proporción peso/volumen
p/p	proporción peso/peso

#### Procedimientos CL – EM y CG-EM:

##### Procedimiento 1(CL-EM):

55 Instrumento: Micromass ZQ con HPLC Waters Alliance 2795; columna: Phenomenex Synergi 2,5 μ MAX-RP 100A Mercury, 20 mm x 4 mm; eluyente A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; gradiente: 0,0 min 90 % A → 0,1 min 90 % A → 3,0 min 5 % A → 4,0 min 5 % A → 4,01 min 90 % de A; caudal: 2 ml/min; horno: 50° C; detección UV: 210 nm.

##### Procedimiento 2 (CL-EM):

Instrumento: Micromass Quattro Premier con HPLC Waters UPLC Acquity; columna: Thermo Hypersil GOLD 1,9 $\mu$  50 mm  $\times$  1 mm; Eluyente A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; gradiente: 0,0 min 90 % A  $\rightarrow$  0,1 min 90 % A  $\rightarrow$  1,5 min 10 % A  $\rightarrow$  2,2 min 10 % A; Horno: 50°C; Caudal: 0,33 (ml/min); Detección UV: 210 nm.

5 Procedimiento 3 (CL-EM):

Instrumento: Micromass Quattro Micro con HPLC Agilent 1100 Series; columna: Thermo Hypersil GOLD 3  $\mu$  20 mm  $\times$  4 mm; Eluyente A: 1 l de agua + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,5 ml de ácido fórmico al 50 %; gradiente: 0,0 min 100 % A  $\rightarrow$  3,0 min 10 % A  $\rightarrow$  4,0 min 10 % A  $\rightarrow$  4,01 min 100 % A (caudal 2,5 ml/min)  $\rightarrow$  5,00 min 100 % A; horno: 50°C; Caudal: 2 (ml/min); Detección UV: 210 nm.

10 Procedimiento 4 (CL-EM):

Instrumento: Waters ACQUITY SQD UPLC System; Columna: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu$  50 mm  $\times$  1 mm;; Eluyente A: 1 l de agua + 0,25 ml de ácido fórmico al 99 %; eluyente B: 1 l de acetonitrilo + 0,25 ml de ácido fórmico al 99 %; gradiente: 0,0 min 90 % A  $\rightarrow$  1,2 min 5 % A  $\rightarrow$  2,0 min 5 % A; Horno: 50°C; Caudal: 0,40 (ml/min); Detección UV: 210 - 400 nm.

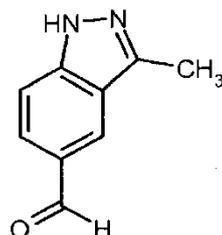
15 Procedimiento 5 (CG-EM):

Instrumento: Micromass GCT, GC 6890; columna: Restek RTX-35, 15 m  $\times$  200  $\mu$ m  $\times$  0,33  $\mu$ m; flujo constante con helio: 0,88 ml/min; horno: 70° C; entrada: 250° C; gradiente: 70° C, 30° C/min  $\rightarrow$  310° C (mantenido durante 3 min).

**Materiales de partida e intermedios:**

**Ejemplo 1A**

20 3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído

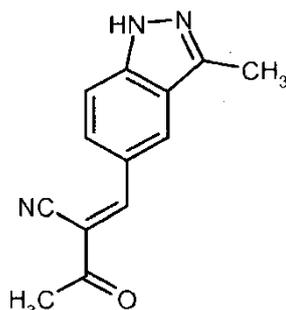


El tetrahidrofurano (600 ml) se enfrió hasta -78°C, en atmósfera de argón. A esta temperatura, gota a gota se añadió una solución 1,7M de *tert*-butil-litio en *n*-pentano (200 ml). Tras 15 minutos a -78° C, una solución de 22,4 g (106,1 mmol) de 5-bromo-3-metil-1*H*-indazol en THF (300 ml) se añadió gota a gota a una velocidad tal que la temperatura de la solución no superó los -70° C. La mezcla se agitó durante 30 minutos antes de añadir gota a gota *N,N*-dimetilformamida (24,5 ml). Tras 20 minutos, se retiró el baño de enfriamiento y la agitación continuó durante 1 hora antes de añadir agua (250 ml) cuidadosamente. La mezcla se extrajo varias veces con acetato de etilo (500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro sódico acuosa saturada, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron a presión reducida, dando 18,5 g de 3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído bruto, que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 13,13 (s a, 1H), 10,01 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,58 (d, 1H), 2,56 (s, 3H) ppm.

**Ejemplo 2A**

(2*E*)-2-[(3-Metil-1*H*-indazol-5-il)metiliden]-3-oxobutanonitrilo



35 Una mezcla de 5,0 g (31,2 mmol) de 3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído (Ejemplo 1A), 3,61 g (34,3 mmol) de (1*Z*)-1-

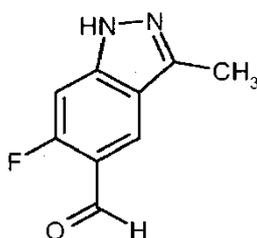
5 cianoprop-1-en-2-olato sódico, 2,23 ml (39 mmol) de ácido acético y 0,31 ml (3,12 mmol) de piperidina en diclorometano seco (250 ml) con un tamiz molecular de 4Å se agitó a reflujo durante 12 h. Después de enfriar se formó un precipitado que se recogió mediante filtración y se lavó con una solución de bicarbonato sódico saturada acuosa y agua. El sólido se disolvió en etanol y el tamiz molecular se eliminó mediante filtración. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se trató con acetato de etilo y una solución de carbonato sódico acuosa saturada. La capa orgánica se lavó con agua, se secó y se concentró a presión reducida, proporcionando el compuesto del título (3,5 g, 50% de t.) como un sólido amarillo claro que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

CL - EM (Procedimiento 1):  $T_r = 1,32$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 226$  (M+H)<sup>+</sup>

10 RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 13,18$  (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,19 (d, 1H), 7,69 (d, 1H), 2,55 (m, 6H) ppm.

### Ejemplo 3A

6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído



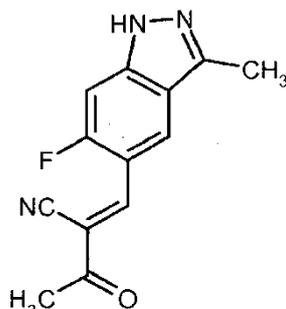
15 Una solución de 30 g (131 mmol) de 5-bromo-6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol [preparación descrita en el documento WO 2005/085227-A1, Ejemplo 104 c); también disponible comercialmente, N° de reg. CAS 864773 - 66 - 0] en THF (525 ml) se enfrió hasta -45° C. Una solución de cloruro de metilmagnesio en THF (3 M; 50,2 ml, 151 mmol) se añadió gota a gota a -45° C y la solución resultante se agitó durante 40 minutos a esta temperatura. Usando una bomba de dosificación se añadieron 253 ml (354 mmol) de una solución de 2-butil litio (1,4 M en ciclohexano) de forma que la temperatura no superó los -40° C. La mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a -40° C y, después, gota a gota se añadieron 30,2 ml (393 mmol) de *N,N*-dimetilformamida manteniendo la temperatura a -40° C. La mezcla resultante se agitó durante 30 min a -40° C, después se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y lentamente se vertió en un volumen de 2,8 l de ácido clorhídrico 2 N enfriado hasta 5° C (baño de agua helada). La mezcla se extrajo varias veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó en diclorometano y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: pentano / acetato de etilo 6:4 v/v), dando 19,6 g (78 % de t.), para dar el compuesto del título como un sólido amarillo claro.

EM (ESIpos):  $m/z = 179$  (M+H)<sup>+</sup>

30 RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 13,14$  (s, 1H), 10,17 (s, 1H), 8,33 (d, 1H), 7,37 (d, 1H), 2,54 (s, 3H) ppm.

### Ejemplo 4A

(*2E*)-2-[(6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-il)metiliden]-3-oxobutanonitrilo

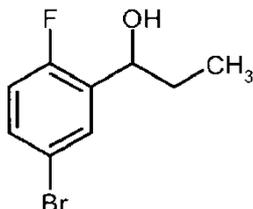


35 Siguiendo el procedimiento descrito para el ejemplo 2A, el compuesto del título se preparó usando 2,74 g (15,5 mmol) de 6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído (Ejemplo 3A) y 2,6 g (24,8 mmol) de (1*Z*)-1-cianoprop-1-en-2-olato sódico, dando 1,6 g (42 % de t.) del producto bruto, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

CL - EM (Procedimiento 4):  $T_r = 0,83$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 244$  (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 5A

1-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-propanol



5

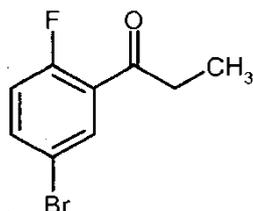
A una solución 15 g (73,9 mmol) de 5-bromo-2-fluorobenzaldehído en éter dietílico anhidro (100 ml) se añadió, lentamente 27,1 ml (81,3 mmol) de una solución de bromuro de etilmagnesio (3M en éter dietílico). Después de agitar a 0°C durante 3 horas, cuidadosamente se añadió agua (20 ml) tras lo cual se formó un precipitado blanco. El sólido se filtró y se lavó con terc-butil metil éter. Los filtrados orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron a presión reducida. El compuesto del título bruto obtenido de este modo (16,1 g, 93 % de t.) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

10

CG - EM (Procedimiento 5):  $T_r = 4,54$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 232$  (M)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 6A

1-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-propanona



15

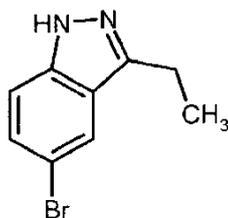
Una mezcla de 10 g (42,9 mmol) de 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-propanol (Ejemplo 5A), 8,75 g (85,8 mmol) de óxido de aluminio neutro y 18,5 g (85,8 mmol) de clorocromato de piridinio en diclorometano (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, la mezcla se filtró a través de gel de sílice (0,06 - 0,2 mm, 200 g), que se lavó extensamente con diclorometano (1000 ml). Los filtrados orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron a presión reducida. El compuesto del título bruto obtenido de este modo (8,6 g, 87 % de t.) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

20

CG - EM (Procedimiento 5):  $T_r = 4,30$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 230$  (M)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 7A

25 5-bromo-3-etil-1H-indazol



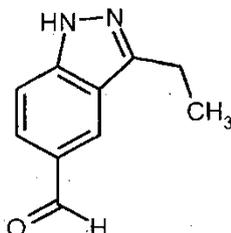
30

Una solución de 7,50 g (32,5 mmol) de 1-(5-bromo-2-fluorofenil)-1-propanona (Ejemplo 6A) en 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 100 ml) se trató con 3,25 g (3,16 ml, 64,9 mmol) de hidrazina hidrato y se agitó a la temperatura de reflujo durante 16 horas. Después de enfriar, la mezcla se vertió en una mezcla de hielo y agua. El precipitado se recogió mediante filtración y se lavó extensamente con agua, dando 4,56 g (62 % de t.) del compuesto del título como un sólido de color beige.

CL - EM (Procedimiento 4):  $T_r = 1,00$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 225$  (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 8A

3-etil-1*H*-indazol-5-carbaldehído



5

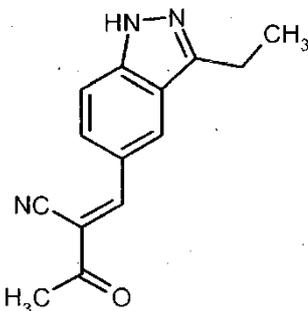
Una solución de 6,90 g (30,7 mmol) de 5-bromo-3-etil-2*H*-indazol (Ejemplo 7A) en THF (300 ml) se enfrió hasta -78° °C. A esta temperatura se añadieron lentamente 63,1 ml (107 mmol) de una solución de *tert*-butil-litio (1,7 M en *n*-pentano). La mezcla se agitó durante a -78° C durante 30 minutos antes de añadir lentamente *N,N*-dimetilformamida (80,0 ml). Se retiró el baño de enfriamiento y la agitación continuó hasta alcanzar la temperatura ambiente. Después se añadió cuidadosamente agua (250 ml). La mezcla se extrajo varias veces con acetato de etilo (500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de cloruro sódico acuosa saturada, se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron a presión reducida, dando 4,5 g (84 % de t.) del compuesto del título bruto que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

10

CL - EM (Procedimiento 4):  $T_r = 0,73$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 175$  (M+H)<sup>+</sup>.

### 15 Ejemplo 9A

(2*E*)-2-[(3-etil-1*H*-indazol-5-il)metiliden]-3-oxobutanonitrilo



Una mezcla de 0,50 g (2,87 mmol) de 3-etil-1*H*-indazol-5-carbaldehído (Ejemplo 8A), 0,33 g (3,16 mmol) de (1*Z*)-1-cianoprop-1-en-2-olato sódico, 0,21 ml (3,6 mmol) de ácido acético y 0,028 ml (0,29 mmol) de piperidina en diclorometano seco (25 ml) con un tamiz molecular de 4Å se agitó a reflujo durante 16 h. Después de enfriar se formó un precipitado que se recogió mediante filtración y se lavó con una solución de bicarbonato sódico saturada acuosa y agua. El sólido se disolvió en etanol y el tamiz molecular se eliminó mediante filtración. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se trató con acetato de etilo y una solución de carbonato sódico acuosa saturada. La capa orgánica se lavó con agua, se secó y se concentró a presión reducida, proporcionando el compuesto del título (0,60 g, 88 % de t.) como un sólido amarillo claro que se usó en las etapas siguientes sin purificación adicional.

25

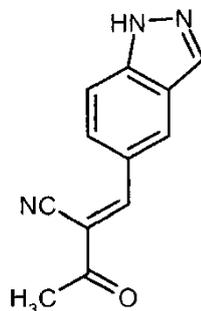
CL - EM (Procedimiento 1):  $T_r = 1,50$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 240$  (M+H)<sup>+</sup>

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 13,17$  (s a, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,67 (d, 1H), 2,97 (c, 2H), 2,55 (m a, 3H), 1,36 (t, 3H) ppm.

30

**Ejemplo 10A**

(2E)-2-(1H-Indazol-5-ilmetiliden)-3-oxobutanonitrilo

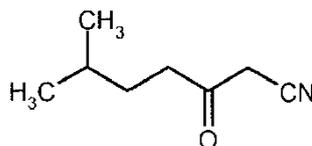


- 5 10 g (68,4 mmol) de 1H-indazol-5-carbaldehído [preparación descrita en el documento US 2005/0227968-A1 (Intermedio 1)], 7,91 g (75,2 mmol) de (1Z)-1-cianoprop-1-en-2-olato sódico, 4,89 ml (85,5 mmol) de ácido acético y 0,68 ml (6,84 mmol) de piperidina en diclorometano seco (500 ml) se agitaron a temperatura de reflujo durante 7 horas usando un separador de agua inverso. Después de enfriar se formó un precipitado, que se recogió mediante filtración y se lavó con diclorometano. El sólido se secó al vacío, dando el compuesto del título bruto (19 g, 75 % de pureza mediante CL-EM, 96 % de t.), que se usó en las etapas siguientes sin purificación adicional.

CL - EM (Procedimiento 2):  $T_r = 0,82$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 212$  (M+H)<sup>+</sup>.

**Ejemplo 11A**

6-metil-3-oxoheptanonitrilo



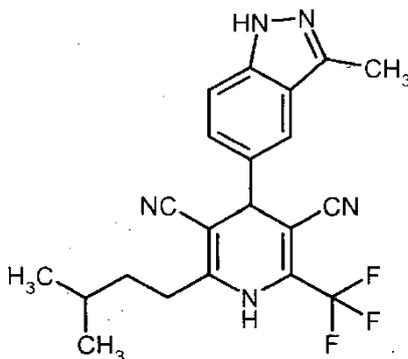
- 15 El tetrahidrofurano (35 ml) se enfrió hasta -70°C, en atmósfera de gas inerte. A esta temperatura, gota a gota se añadieron 4,44 ml (11,1 mmol) de una solución de n-butil-litio (2,5M en hexanos) y después 0,51 ml (9,71 mmol) de acetonitrilo. Tras 3 minutos a -70° C, gota a gota se añadieron 1,15 ml (6,93 mmol) de 4-metilpentanoato de etilo a una velocidad tal que la temperatura de la solución no superó los -66° C. La mezcla se agitó durante 2 horas a -45°C antes de añadir gota a gota 22,2 ml de ácido clorhídrico 1N. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo resultante se mezcló con éter dietílico. Después de la filtración en gel de sílice, el filtrado se evaporó a presión reducida, dando 1,05 g del compuesto del título en bruto, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

CG - EM (Procedimiento 5):  $T_r = 3,23$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 138$  (M-H)<sup>+</sup>

- 25 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 4,03$  (s, 2H), 2,51 (t, 2H), 1,50 (sext, 1H), 1,38 (c, 2H), 1,35 (d, 6H) ppm.

Los siguientes compuestos se prepararon a partir del correspondiente éster y acetonitrilo de forma análoga al procedimiento descrito en el Ejemplo 11A:

Ejemplo	Estructura	CG - EM (Procedimiento 5):	RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ):
12A		$T_r = 2,39$ min; $m/z = 165$ (M) <sup>+</sup>	$\delta = 4,09$ (s, 2H), 2,80 (t, 2H), 2,51 - 2,40 (m, 2H) ppm
13A		$T_r = 2,96$ min; $m/z = 179$ (M) <sup>+</sup>	$\delta = 4,02$ (s, 2H), 2,62 (t, 2H), 2,31 - 2,19 (m, 2H), 1,72 - 1,63 (m, 2H) ppm

**Ejemplos de preparación:****Ejemplo 1**2-(3-Metilbutil)-4-(3-metil-1*H*-indazol-5-il)-6-(trifluorometil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo

5

Una suspensión de 250 mg (1,56 mmol) de 3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído (Ejemplo 1A), 850 mg (6,24 mmol) de 3-amino-4,4,4-trifluorobut-2-enonitrilo [preparación. A.W. Lutz, patente de EE.UU. 3.635.977; C.G. Krespan, J. Org. Chem. 34, 42 (1969)], 346 mg (2,19 mmol) 6-metil-3-oxoheptanonitrilo (Ejemplo 11A) y 75 mg de tamiz molecular de 4Å en polvo en 1-pentanol (1,6 ml) se calentó hasta 105° C durante la noche. Después de enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con acetonitrilo y se filtró y el filtrado se purificó directamente mediante HPLC-FI preparativa (gradiente de acetonitrilo/agua + 0,1 % TFA), dando 161 mg (26 % de t.) del compuesto del título racémico.

10

CL - EM (Procedimiento 4):  $T_r = 1,06$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 400$  (M+H)<sup>+</sup>

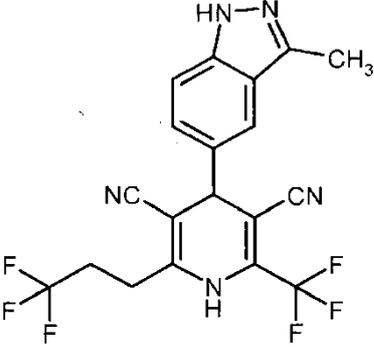
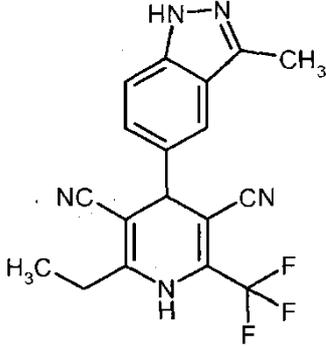
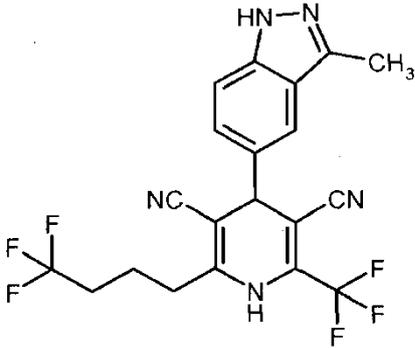
RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 12,78$  (s, 1H), 10,72 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,28 (d, 1H), 4,78 (s, 1H), 2,52 - 2,39 (m, 5H), 1,65 - 1,40 (m, 3H), 0,90 (dd, 6H) ppm.

15

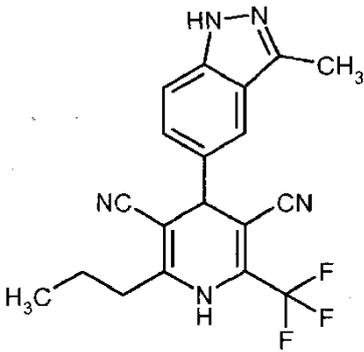
Los compuestos siguientes se prepararon a partir de ejemplo 1A de forma análoga al procedimiento descrito para el ejemplo 1; la purificación se llevó a cabo mediante HPLC-FI preparativa en un gradiente de acetonitrilo/agua + 0,05 % de TFA.

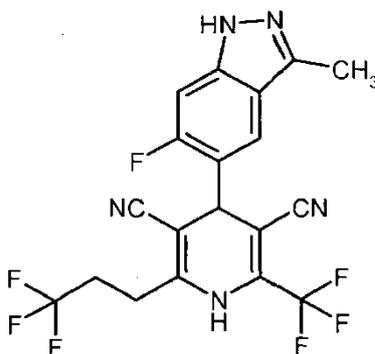
Ejemplo	Nombre / Estructura (rendimiento)	Datos analíticos
<b>2</b>	2-butil-4-(3-metil-1 <i>H</i> -indazol-5-il)-6-(trifluorometil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo    (16 % de t.)	CL - EM (Procedimiento 3): $T_r = 2,17$ min; $m/z = 386$ (M+H) <sup>+</sup>  RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta = 12,78$ (s, 1H), 10,72 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 4,78 (s, 1H), 2,52 - 2,39 (m, 5H), 1,63 - 1,53 (m, 2H), 1,41 - 1,29 (m, 2H), 0,92 (t, 3H) ppm.

(continuación)

Ejemplo	Nombre / Estructura (rendimiento)	Datos analíticos
3	<p>4-(3-metil-1<i>H</i>-indazol-5-il)-2-(trifluorometil)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo</p>  <p>(24 % de t.)</p>	<p>CL - EM (Procedimiento 4): <math>T_r = 0,98</math> min; <math>m/z = 426</math> (M+H)<sup>+</sup></p> <p>RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>): <math>\delta = 12,78</math> (s, 1H), 10,72 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,31 (d, 1H), 4,81 (s, 1H), 2,78 - 2,58 (m, 4H), 2,49 (s, 3H) ppm</p>
4	<p>2-etil-4-(3-metil-1<i>H</i>-indazol-5-il)-6-(trifluorometil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo</p>  <p>(9 % de t.)</p>	<p>CL - EM (Procedimiento 4): <math>T_r = 0,91</math> min; <math>m/z = 358</math> (M+H)<sup>+</sup></p> <p>RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>): <math>\delta = 12,78</math> (s, 1H), 10,22 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 4,78 (s, 1H), 2,49 - 2,40 (m, 5H), 1,19 (t, 3H) ppm.</p>
5	<p>4-(3-metil-1<i>H</i>-indazol-5-il)-2-(4,4,4-trifluorobutil)-6-(trifluorometil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo</p>  <p>(30 % de t.)</p>	<p>CL - EM (Procedimiento 4): <math>T_r = 1,01</math> min; <math>m/z = 440</math> (M+H)<sup>+</sup></p> <p>RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>): <math>\delta = 12,78</math> (s, 1H), 10,22 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,30 (d, 1H), 4,79 (s, 1H), 2,52 - 2,43 (m, 5H), 2,39 - 2,23 (m, 2H), 1,87 - 1,74 (m, 2H) ppm.</p>

(continuación)

Ejemplo	Nombre / Estructura (rendimiento)	Datos analíticos
6	<p data-bbox="354 369 906 421">4-(3-metil-1<i>H</i>-indazol-5-il)-2-propil-6-(trifluorometil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo</p>  <p data-bbox="571 884 686 913">(8 % de t.)</p>	<p data-bbox="938 369 1433 421">CL - EM (Procedimiento 2): <math>T_r = 1,09</math> min; <math>m/z = 372</math> (M+H)<sup>+</sup></p> <p data-bbox="938 492 1433 604">RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>): <math>\delta = 12,79</math> (s a, 1H), 10,20 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,57 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 4,79 (s, 1H), 2,49 - 2,33 (m, 5H), 1,60 (quin, 2H), 0,92 (t, 3H) ppm.</p>

**Ejemplo 7**4-(6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-il)-2-(trifluorometil)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo

5

10

Una suspensión de 151 mg (0,85 mmol) de 6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído (Ejemplo 3A), 346 mg (2,54 mmol) de 3-amino-4,4,4-trifluorobut-2-enonitrilo [preparación. A.W. Lutz, patente de EE.UU. 3.635.977; C.G. Krespan, J. Org. Chem. 34, 42 (1969)], 200 mg (0,85 mmol, aprox., 70% de pureza) de 6,6,6-trifluoro-3-oxohexanonitrilo (Ejemplo 12A) y 41 mg de tamiz molecular de 4Å en polvo en 1-pentanol (0,85 ml) se calentó hasta 105° C durante la noche. Después de enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con THF y se filtró y el filtrado se purificó directamente mediante HPLC-FI preparativa (gradiente de acetonitrilo/agua + 0,1 % TFA), dando 99 mg (25 % de t.) del compuesto del título racémico.

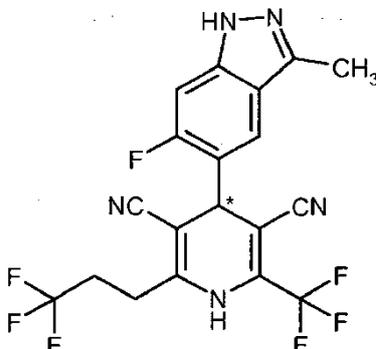
CL - EM (Procedimiento 4):  $T_r = 1,00$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 444$  (M+H)<sup>+</sup>

15

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 12,82$  (s a, 1H), 10,47 (s, m), 7,72 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 5,04 (s, 1H), 2,75 - 2,55 (m, 4H), 2,49 (s, 3H) ppm.

**Ejemplo 8 y Ejemplo 9**

4-(6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-il)-2-(trifluorometil)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo (*enantiómero 1 y 2*)



5

El compuesto racémico del ejemplo 7 (70 mg) se separó en los enantiómeros mediante cromatografía HPLC en una fase quiral [columna: fase de gel de sílice quiral en base al selector poli(N-metacrilóil-L-leucina-*terc*-butilamida) (véase el documento EP 0 379 917, EP 0 780 408), 10  $\mu$ m, 400 mm x 30mm; eluyente: gradiente de Iso-hexano / acetato de etilo 20:80  $\rightarrow$  0:100, v/v; caudal: 50 ml/min; temperatura: 24 °C; detección UV: 265 nm]:

10 **Ejemplo 8 (*enantiómero 1*):**

Rendimiento: 37 mg (99 % ee)

Tr = 2,13 min [columna: fase de gel de sílice quiral en base al selector poli(N-metacrilóil-L-leucina-*terc*-butilamida) 10  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm; eluyente: *iso*-hexano / acetato de etilo 1:1 v/v; caudal: 2 ml/min; detección UV: 265 nm].

15 La purificación adicional de este material mediante HPLC-FI preparativa (gradiente metanol / agua + 0,1 % TFA) dio 11 mg del enantiómero del título.

**Ejemplo 9 (*enantiómero 2*):**

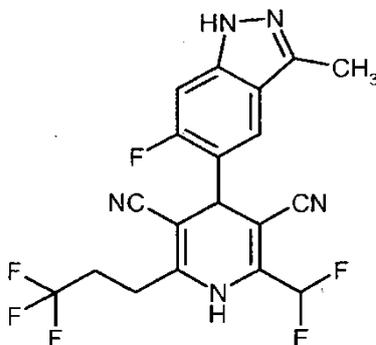
Rendimiento: 25 mg (> 98 % ee)

Tr = 2,92 min [columna: fase de gel de sílice quiral en base al selector poli(N-metacrilóil-L-leucina-*terc*-butilamida) 10  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm; eluyente: *iso*-hexano / acetato de etilo 1:1 v/v; caudal: 2 ml/min; detección UV: 265 nm].

20 La purificación adicional de este material mediante HPLC-FI preparativa (gradiente metanol / agua + 0,1 % TFA) dio 17 mg del enantiómero del título.

**Ejemplo 10**

2-(Difluorometil)-4-(6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-il)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo



25

Una mezcla de 227 mg (1,27 mmol) de 6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-carbaldehído (Ejemplo 3A), 150 mg (1,27 mmol) de 3-amino-4,4-difluorobut-2-enonitrilo [obtenible mediante reacción de Thorpe de acetonitrilo con 2,2-difluoroacetnitrilo, véase Org. React. 15, 1 (1967), ibid. 31, 1 (1984)], 300 mg (1,27 mmol, aprox. pureza de 70 %) de 6,6,6-trifluoro-3-oxohexanonitrilo (Ejemplo 12A) y 61 mg del tamiz molecular de 4Å en polvo en 1-pentanol (1,3

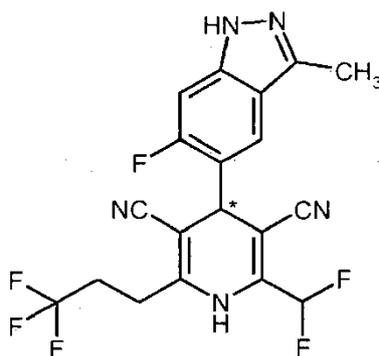
ml) se calentó hasta 105° C durante la noche. Después de enfriar, la mezcla de reacción se diluyó con THF y se filtró y el filtrado se purificó directamente mediante HPLC-FI preparativa (gradiente de acetonitrilo/agua + 0,1 % TFA), dando 248 mg (43 % de t.) del compuesto del título racémico.

CL - EM (Procedimiento 2):  $T_r = 1,07$  min; EM (ESIpos):  $m/z = 426$  (M+H)<sup>+</sup>

- 5 RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 12,82$  (s a, 1H), 10,20 (s, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,31 (d, 1H), 6,82 (t, 1H), 4,96 (s, 1H), 2,72 - 2,55 (m, 4H), 2,49 (s, 3H) ppm.

### Ejemplo 11 y Ejemplo 12

2-(Difluorometil)-4-(6-fluoro-3-metil-1*H*-indazol-5-il)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo (*enantiómero 1 y 2*)



10

El compuesto racémico del ejemplo 10 (225 mg) se separó en los enantiómeros mediante cromatografía HPLC en una fase quiral [columna: fase de gel de sílice quiral en base al selector poli(N-metacriloil-L-leucina-*terc*-butilamida) (véase el documento EP 0 379 917, EP 0 780 408), 10  $\mu$ m, 680 mm x 40 mm; eluyente: *iso*-hexano / acetato de etilo 20:80 v/v; caudal: 80 ml/min; temperatura: 24° C; detección UV: 265 nm]:

15

#### Ejemplo 11 (*enantiómero 1*):

Rendimiento: 40 mg (> 97 % ee)

$T_r = 2,10$  min [columna: fase de gel de sílice quiral en base al selector poli(N-metacriloil-L-leucina-*terc*-butilamida) 10  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm; eluyente: acetato de etilo; caudal: 2 ml/min; detección UV: 265 nm].

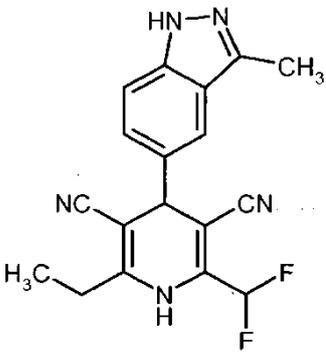
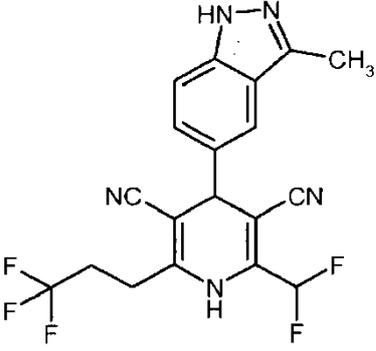
#### 20 Ejemplo 12 (*enantiómero 2*):

Rendimiento: 45 mg (> 97 % ee)

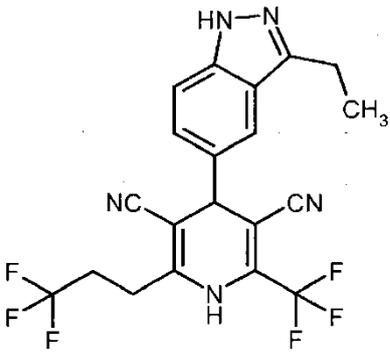
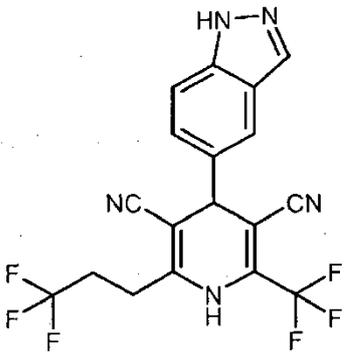
$T_r = 2,47$  min [columna: fase de gel de sílice quiral en base al selector poli(N-metacriloil-L-leucina-*terc*-butilamida) 10  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm; eluyente: acetato de etilo; caudal: 2 ml/min; detección UV: 265 nm].

25

Los compuestos siguientes se prepararon a partir del ejemplo 1A de forma análoga al procedimiento descrito para el ejemplo 10; la purificación se llevó a cabo mediante HPLC-FI preparativa en un gradiente de acetonitrilo/agua + 0,1 % de TFA.

Ejemplo	Nombre / Estructura (rendimiento)	Datos analíticos
13	2-(difluorometil)-6-etil-4-(3-metil-1 <i>H</i> -indazol-5-il)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo  (24 % de t.) <sup>1</sup>	CL - EM (Procedimiento 4): $T_r = 0,86$ min; $m/z = 340$ (M+H) <sup>+</sup>  RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta = 12,72$ (s, 1H), 10,02 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,28 (d, 1H), 6,81 (t, 1H), 4,70 (s, 1H), 2,49 (s, 3H), 2,40 (quin, 2H), 1,19 (t, 3H) ppm.
14	2-(Difluorometil)-4-(3-metil-1 <i>H</i> -indazol-5-il)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo  (23 % de t.) <sup>2</sup>	CL - EM (Procedimiento 4): $T_r = 0,93$ min; $m/z = 408$ (M+H) <sup>+</sup>  RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta = 12,72$ (s, 1H), 10,12 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,52 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 6,82 (t, 1H), 4,72 (s, 1H), 2,78 - 2,55 (m, 4H), 2,49 (s, 3H) ppm.
<sup>1</sup> ) tras purificación mediante HPLC-FI preparativa [columna: Sunfire C18 OBD, 5 $\mu$ m, 19 mm x 150 mm; eluyente: Gradiente de agua / metanol 80:20 $\rightarrow$ 0:100, v/v; caudal: 25 ml/min; temperatura: 40° C; detección UV: 254 nm]. <sup>2</sup> ) tras purificación primero mediante HPLC-FI preparativa [columna: Sunfire C18 OBD, 5 $\mu$ m, 19 mm x 150 mm; eluyente: Gradiente de agua / metanol 80:20 $\rightarrow$ 0:100, v/v; caudal: 25 ml/min; temperatura: 40° C; detección UV: 254 nm], seguido de cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (eluyente: tolueno/diclorometano/metanol 10:10:1 v/v/v).		

Los compuestos siguientes se prepararon a partir del ejemplo 1A de forma análoga al procedimiento del Ejemplo 7; la purificación se llevó a cabo mediante HPLC-FI preparativa usando un gradiente de metanol/agua + 0,05 % de TFA.

Ejemplo	Nombre / Estructura (rendimiento)	Datos analíticos
15	4-(3-etil-1H-indazol-5-il)-2-(trifluorometil)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo  (6 % de t.)	CL - EM (Procedimiento 4): $T_r = 1,00$ min; $m/z = 440$ (M+H) <sup>+</sup>  RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta = 12,74$ (s, 1H), 10,30 (s a, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,31 (d, 1H), 4,69 (s, 1H), 2,93 (c, 2H), 2,60 - 2,50 (m, 4H), 1,31 (t, 3H) ppm.
16	4-(1H-indazol-5-il)-2-(trifluorometil)-6-(3,3,3-trifluoropropil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dicarbonitrilo  (7 % de t.) <sup>3</sup>	CL - EM (Procedimiento 4): $T_r = 0,97$ min; $m/z = 412$ (M+H) <sup>+</sup>  RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ): $\delta = 13,19$ (s, 1H), 10,33 (s a, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,62 (d, 1H), 7,35 (d, 1H), 4,84 (s, 1H), 2,80 - 2,50 (m, 4H) ppm.
<sup>3)</sup> tras purificación mediante HPLC-FI preparativa [columna: Sunfire C18, 5 $\mu$ m, 19 mm x 150 mm; eluyente: gradiente de agua / acetonitrilo 60:40 v/v; caudal: 25 ml/min; temperatura: 40° C; detección UV: 210 nm].		

## B. Evaluación de la actividad biológica

- 5 La demostración de la actividad de los compuestos de la presente invención se puede obtener a través de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, para demostrar la actividad de los compuestos de la presente invención se pueden usar los ensayos siguientes.

### Ensayo de la actividad del receptor tirosina quinasa c-Met (lectura de NADH):

- 10 Se usa la proteína c-Met humana recombinante (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Como sustrato para la reacción quinasa se usa el péptido KKKSPGEYVNIEFG (JPT, Alemania). Para el ensayo, 1  $\mu$ l de la solución concentrada 51 veces del compuesto de ensayo en DMSO se pipetea en una placa de microtitulación de 384 pocillos blanca (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Se añaden 25  $\mu$ l de una solución de c-Met (concentración final 30 nM) y piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania; concentración final 8 mg/l) en tampón de ensayo ácido [3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), 50 mM, pH 7; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; seroalbúmina bovina (BSA), 0,01 %; Triton X 100, 0,01 %; DTT, 2 mM] y la mezcla se incuba durante
- 15 5 minutos a temperatura ambiente. Después se inicia la reacción quinasa mediante la adición de 25  $\mu$ l de una solución de adenosín trifosfato (ATP, concentración final 30  $\mu$ M), sustrato (concentración final 100  $\mu$ M), dinucleótido

de nicotinamida adenina (NADH, concentración final 50  $\mu\text{M}$ ) y ditioneitol (DTT, concentración final 2  $\mu\text{M}$ ) en tampón de ensayo y la mezcla resultante se incuba durante un tiempo de reacción de 100 min a 32° C.

Después, la cantidad de sustrato fosforilado se evalúa mediante la medición de la disminución de la fluorescencia de NADH. Por tanto, las emisiones de fluorescencia a 465 nm tras la excitación a 340 nm se mide en un lector de fluorescencia, por ejemplo Tecan Ultra (Tecan, Männedorf, Suiza). Los datos se normalizan (reacción enzimática sin inhibidor = 0 % de inhibición; todos los demás componentes del ensayo pero sin enzima = 100% de inhibición). Normalmente, los compuestos de ensayo se analizan en la misma placa de microtitulación a 9 concentraciones diferentes en el intervalo de 10  $\mu\text{M}$  a 1 nM (10  $\mu\text{M}$ , 3,1  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,03  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,003  $\mu\text{M}$ , 0,001  $\mu\text{M}$ ; una serie de diluciones preparada antes del ensayo a partir de soluciones madre 51 veces más concentradas mediante dilución en serie 1:3) por duplicado para cada concentración, y los valores de  $\text{CI}_{50}$  se calculan usando un software interno.

Algunos valores de  $\text{CI}_{50}$  representativos se enumeran en la Tabla 1 siguiente junto con los datos correspondientes para un compuesto no fluorado estructuralmente relacionado de la técnica anterior (véase el documento WO 2008/071451):

15 Tabla 1

Nº de ejemplo	$\text{CI}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
1	0,016
7	0,052
10	0,026
13	0,009
14	0,017
16	0,029
<i>Ejemplo sintético 4 en el documento WO 2008/071451</i>	0,008

**Ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo con receptor tirosina quinasa c-Met (formato alternativo):**

20 Se usa el dominio quinasa recombinante marcado con His6 N-terminal de la c-Met humana (aminoácidos 960 - 1390) expresado en células de insecto (SF21) y purificado mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA y cromatografía de exclusión por tamaño consecutiva (Superdex 200). Como alternativa, se puede usar c-Met disponible comercialmente (Millipore). Como sustrato de la reacción quinasa se usa el copolímero poli-Glu,Tyr (4:1) biotinilado (nº 61 GT0BLC, Cis Biointernational, Marcoule, Francia).

25 Para el ensayo, 50 nl de la solución concentrada por 100 del compuesto de ensayo en DMSO se pipetea en una placa de microtitulación de 384 pocillos negra (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Se añaden 2  $\mu\text{l}$  de una solución de de c-Met en tampón de ensayo [HEPES 25 mM / NaOH, pH 7,5;  $\text{MgCl}_2$  5 mM;  $\text{MnCl}_2$  5 mM; ditioneitol 2 mM; 0,1 % (v/v) de Tween 20 (Sigma); 0,1 % (p/v) de seroalbúmina bovina] y la mezcla se incuba durante 15 minutos a 22° C para permitir una pre-unión del compuesto de ensayo a la enzima antes del inicio de la reacción con la quinasa. Después, la reacción quinasa se inicia mediante la adición de 3  $\mu\text{l}$  de una solución de adenosina trifosfato (ATP, 16,7  $\mu\text{M}$ ; concentración final en el volumen de ensayo de 5  $\mu\text{l}$  es 10  $\mu\text{M}$ ) y sustrato (2,27  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , concentración final en el volumen de ensayo de 5  $\mu\text{l}$  es 1,36  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~30 nM) en tampón de ensayo y la mezcla resultante se incuba durante un tiempo de reacción de 30 minutos a 22 °C. La concentración de c-Met en el ensayo se ajusta dependiendo de la actividad del lote de enzima y se escoge adecuadamente para tener el ensayo en el intervalo lineal; las concentraciones enzimáticas típicas se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,03 nM (concentración final en el volumen de ensayo 5  $\mu\text{l}$ ). La reacción se detiene mediante la adición de 5  $\mu\text{l}$  de una solución de reactivos de detección HTRF [estreptavidina-XLent 40 nM y PT66-Eu-quelato 2,4 nM, un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con quelato de europio (Perkin-Elmer)] en una solución acuosa de EDTA [EDTA 100 mM, 0,2 % (P/v) de seroalbúmina bovina en HEPES /NaOH, 50 mM a pH 7,5].

40 La mezcla resultante se incuba durante 1 hora a 22 °C para permitir la unión del péptido fosforilado biotinilado a estreptavidina-XLent y al PT66-Eu-quelato. Después, la cantidad de sustrato fosforilado se evalúa mediante la medición de la transferencia de energía de resonancia desde el PT66-Eu-quelato a estreptavidina-XLent. Por tanto, las emisiones de fluorescencia a 620 nm y 665 nm tras la excitación a 350 nm se miden en un lector de HTRF, por ejemplo Rubystar (BMG Lab-technologies, Offenburg, Alemania) o Viewlux (Perkin-Elmer). La proporción entre las emisiones a 665 nm y a 622 nm se toma como la medida para la cantidad de sustrato fosforilado. Los datos se

normalizan (reacción enzimática sin inhibidor = 0 % de inhibición; todos los demás componentes del ensayo pero sin enzima = 100% de inhibición). Normalmente, los compuestos de ensayo se analizan en la misma placa de microtitulación a 10 concentraciones diferentes en el intervalo de 20  $\mu\text{M}$  a 1 nM (20  $\mu\text{M}$ , 6,7  $\mu\text{M}$ , 2,2  $\mu\text{M}$ , 0,74  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 82 nM, 27 nM, 9,2 nM, 3,1 nM y 1 nM; una serie de diluciones preparada antes del ensayo a partir de soluciones madre concentradas 100 veces más mediante dilución en serie 1:3) por duplicado para cada concentración, y los valores de  $\text{CI}_{50}$  se calculan usando un software interno.

Algunos valores de  $\text{CI}_{50}$  representativos se enumeran en la Tabla 2 siguiente junto con los datos correspondientes para un compuesto no fluorado estructuralmente relacionado de la técnica anterior (véase el documento WO 2008/071451):

Tabla 2

Nº de ejemplo	$\text{CI}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
4	0,011
10	0,011
<i>Ejemplo sintético 4 en el documento WO 2008/071451</i>	0,002

#### **Ensayo de fosfo-c-Met:**

Este es un ensayo celular similar a ELISA [Meso Scale Discovery (MSD), Gaithersburg, MD, EE.UU.] que usa células tumorales MKN-45 (carcinoma gástrico, adquiridas de la ATCC) sin estimulación con el factor de crecimiento. El día uno, las células se siembran en medio de crecimiento completo (10.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos. El día dos, tras un tratamiento con fármaco de dos horas en medio sin suero, las células se lavan y después se lisan (60  $\mu\text{l}$ /pocillo usando tampón de lisis recomendado por MSD) y se congelan a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Asimismo, el día dos, los sitios de unión inespecífica al anticuerpo en las placas de fosfo-Met de MSD se bloquean con solución de bloqueo A de MSD durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . El día 3, los lisados congelados se descongelan en hielo y se transfieren 25  $\mu\text{l}$  del lisado a la placa con fosfo-Met de MSD, durante 1 hora con agitación, después de lavar una vez con solución salina tamponada con Tris + 0,05 % de Tween 20 (TBST). Después de eliminar las proteínas no unidas, el anticuerpo anti-Met Sulfa-TAG de MSDA se añade a la placa a una concentración final de 5 nM en tampón de dilución de anticuerpos (siguiendo el protocolo de MSD) durante 1 hora con agitación. Después, la placa se lava con tampón TBST tres veces después de añadir 1 x tampón de lectura de MSD. Después, la placa se lee en el instrumento MSD Discovery Workstation. Los datos brutos, incluyendo los pocillos con 10  $\mu\text{M}$  de un compuesto de referencia (señal mínima) y los pocillos con DMSO sin ningún tratamiento con fármaco (señal máxima), se introducen en el programa Analyze 5 para las determinaciones de los valores de  $\text{CI}_{50}$ .

#### **Ensayo celular de fosfo-c-Met:**

Las células de adenocarcinoma gástrico humanas (MKN45, adquiridas en la ATCC) sembradas en placas de microtitulación de 384 pocillos (9.000 células/pocillo) se incuban en 25  $\mu\text{l}$  de medio de crecimiento completo durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . El día dos, después de un tratamiento con fármaco de dos horas en medio con suero reducido que contiene 0,1 % FCS, las células se lavan y se lisan. Los lisados se transfieren a placas bloqueadas con BSA con anticuerpo de captura de c-Met previamente unido [adquirido en Mesoscale Discovery (MSD), Gaithersburg, MD, EE.UU.] durante 1 hora con agitación, después de lavar una vez con solución salina tamponada con Tris + 0,05 % de Tween 20 (TBST). Siguiendo el protocolo de MSD, el anticuerpo de detección anti-fosfo-c-Met Sulfa-TAG se añade a la placa a una concentración final de 5 nM en tampón de dilución de anticuerpos durante 1 hora con agitación a TA. Después de lavar las células con tampón Tris se añade 1x de tampón de lectura y las placas se miden en el Sector Imager 6000 (adquirido en Mesoscale). Los valores  $\text{CI}_{50}$  se calculan a partir de las curvas de dosis-respuesta usando el algoritmo de Marquardt-Levenberg.

#### **Ensayos de proliferación de células tumorales *in vitro*:**

El ensayo de proliferación de células tumorales adherentes usado para analizar los compuestos de la presente invención implica una lectura denominada Cell Titre-Glo desarrollada por Promega [B.A. Cunningham, "A Growing Issue: Cell Proliferation Assays. Modern kits ease quantification of cell growth", The Scientist 2001, 15 (13), 26; S.P. Crouch et al., "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity", journal of Immunological Methods 1993, 160, 81 - 88]. La generación de una señal luminiscente corresponde a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (en proliferación).

Las células H460 (carcinoma de pulmón, adquiridas en la ATCC) se siembran en placas de 96 pocillos a 3.000 células / pocillo en medio completo con 10% de suero bovino fetal y se incuban 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Veinticuatro horas después de la siembra en las placas, los compuestos de ensayo se añaden en un intervalo de concentración final de 10 nM a 20  $\mu\text{M}$  en diluciones en serie a una concentración final de DMSO de 0,2%. Las células se incuban durante

72 horas a 37 °C en medio de crecimiento completo tras la adición del compuesto de ensayo. El día 4, usando el kit de ensayo Promega Cell Titre-Glo, las células se lisan y a cada pocillo se añaden 100 µl de mezcla sustrato/tampón, se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 8 minutos. Las muestras se leen en un luminómetro para medir la cantidad de ATP presente en los lisados celulares de cada pocillo, que corresponde al número de células viables en dicho pocillo. Los valores leídos a una incubación de 24 horas se restan como el día 0. Para la determinación de los valores de  $CI_{50}$  se puede usar un análisis de regresión lineal para determinar la concentración de fármaco, que tiene como resultado una inhibición del 50% de la proliferación celular usando este formato de ensayo. Este protocolo se puede aplicar a diferentes líneas celulares de interés, que incluyen, entre otros, CAKI-1, MNK-45, GTL-16, HCC2998, K562, H441, K812, MEG01, SUP15 y HCT116.

### 10 **Ensayo de permeabilidad de Caco-2:**

La permeación *in vitro* de un compuesto de ensayo a través de una monocapa celular Caco-2 es un sistema de ensayo bien establecido para predecir la permeabilidad del tracto gastrointestinal [véase, P. Artursson and J. Karlsson: Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys.* 175 (3), 880 - 885 (1991)]. La permeabilidad de los compuestos de la presente invención en dichas células Caco-2 se determinó como se describe más adelante:

Se siembran células humanas Caco-2 (N° en ACC 169 DSMZ, Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Braunschweig, Alemania) en placas de insertos de 24 pocillos y se dejan crecer durante 14 - 16 días. Para los estudios de permeabilidad, los compuestos de ensayo se disuelven en DMSO y se diluyen hasta la concentración final del ensayo de 2 µM con tampón de transporte [solución salina tamponada de Hank, Gibco/Invitrogen, suplementada adicionalmente con glucosa (concentración final 19,9 mM) y HEPES (concentración final 9,8 mM)]. Para la determinación de la permeabilidad apical a basolateral ( $P_{appA-B}$ ), la solución del compuesto de ensayo se añade al lado apical de la monocapa celular y el tampón de transporte al lado basolateral de la monocapa; para la determinación de la permeabilidad basolateral a apical ( $P_{appB-A}$ ), la solución del compuesto de ensayo se añade al lado basolateral de la monocapa celular y el tampón de transporte al lado apical de la monocapa. Las muestras se extraen del compartimento donante al principio del experimento para confirmar el equilibrio de masas. Tras una incubación de 2 horas a 37°C, las muestras se extraen de ambos compartimentos. Las muestras se analizan mediante CL-EM/EM y se calculan los coeficientes aparentes de permeabilidad. La permeabilidad al amarillo Lucifer se analiza para cada monocapa celular para garantizar la integridad de la monocapa celular y la permeabilidad a atenolol (marcador de baja permeabilidad) y sulfasalazina (marcador de excreción activa) se determina para cada lote como control de calidad.

Los resultados representativos de este ensayo se enumeran en la Tabla 3 siguiente junto con los datos correspondientes para un compuesto no fluorado estructuralmente relacionado de la técnica anterior (véase el documento WO 2008/071451):

Tabla 3

Nº de ejemplo	Permeabilidad de Caco-2 $P_{appA-B}$ [nm/s]
1	217
7	204
13	259
<i>Ejemplo sintético 4 en el documento WO 2008/071451</i>	124

### 35 **C. Ejemplos relacionados con las composiciones farmacéuticas**

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden ilustrar del siguiente modo:

#### Solución i.v. estéril:

Una solución de 5 mg/ml del compuesto deseado de la presente invención se puede preparar usando agua estéril para inyectables y, en caso necesario, se ajusta el pH. La solución se diluye para administración a 1 - 2 mg/ml con dextrosa al 5% estéril y se administra como una infusión i.v. durante aproximadamente 60 minutos.

#### Polvo liofilizado para administración i.v.:

Se puede preparar una preparación estéril con (i) 100 - 1000 mg del compuesto deseado de la presente invención como un polvo liofilizado, (ii) 32 - 327 mg/ml de citrato sódico y (iii) 300 - 3000 mg de dextrano 40. La formulación se reconstituye con solución salina inyectable estéril o 5% de dextrosa hasta una concentración de 10 a 20 mg/ml, que además se diluye con solución salina o 5% de dextrosa hasta de 0,2 a 0,4 mg/ml y se administra como un bolo i.v. o mediante infusión i.v. durante 15 - 60 minutos.

Suspensión intramuscular:

La siguiente solución o suspensión se puede preparar para inyección intramuscular:

50 mg/ml del compuesto insoluble en agua deseado de la presente invención; 5 mg/ml de carboximetilcelulosa sódica; 4 mg/ml de TWEEN 80; 9 mg/ml de cloruro sódico; 9 mg/ml de alcohol bencílico.

5 Cápsula de cubierta dura:

Se prepara un gran número de cápsulas unitarias cargando cápsulas de gelatina dura convencionales de dos piezas con 100 mg de principio activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda:

10 Se prepara una mezcla de ingrediente activo en un aceite digerible, tal como aceite de soja, aceite de semilla de algodón o aceite de oliva y se inyecta por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina fundida, para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 mg de principio activo. Las cápsulas se lavan y se secan. El principio activo se puede disolver en una mezcla de polietilenglicol, glicerina y sorbitol, para preparar una mezcla de medicina miscible en agua.

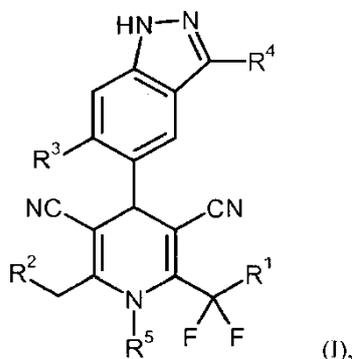
Comprimidos:

15 Se prepara un gran número de comprimidos mediante procedimientos convencionales, de modo que la unidad de dosis sea de 100 mg del principio activo, 0,2 mg de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato de magnesio, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg de almidón y 98,8 mg de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos acuosos y no acuosos adecuados para incrementar la palatabilidad, mejorar la elegancia y la estabilidad o retrasar la absorción.

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5

en la que

- R<sup>1</sup> es hidrógeno o flúor,  
 R<sup>2</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>) opcionalmente sustituido con hasta cinco átomos de flúor,  
 R<sup>3</sup> es hidrógeno o flúor,  
 R<sup>4</sup> es hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>);  
 y  
 R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo,

10

o una sal, hidrato y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de fórmula (I) acuerdo con la reivindicación 1, en el que

- R<sup>1</sup> es hidrógeno o flúor,  
 R<sup>2</sup> es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) opcionalmente sustituido con hasta tres átomos de flúor,  
 R<sup>3</sup> es hidrógeno o flúor,  
 R<sup>4</sup> es hidrógeno, metilo o etilo,  
 y  
 R<sup>5</sup> es hidrógeno,

15

20

o una sal, hidrato y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que

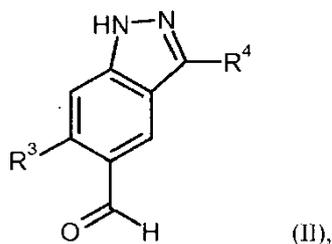
- R<sup>1</sup> es hidrógeno o flúor,  
 R<sup>1</sup> es metilo, etilo, 2,2,2-trifluoroetilo, propilo, 3,3,3-trifluoropropilo o 2-metilpropilo,  
 R<sup>3</sup> es hidrógeno o flúor,  
 R<sup>4</sup> es hidrógeno o metilo,  
 y  
 R<sup>5</sup> es hidrógeno,

25

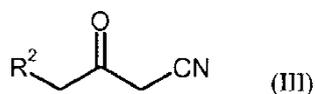
o una sal, hidrato y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I) como se define en las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** un aldehído indazolilo de fórmula (II)

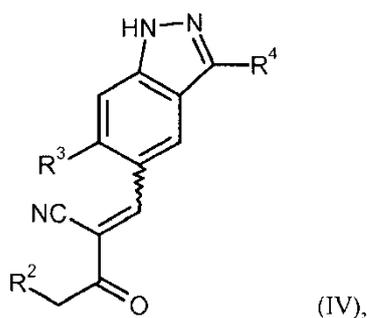
30



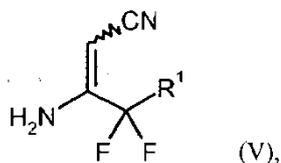
en la que R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> tienen los significados indicados en las reivindicaciones 1 a 3, se hace reaccionar con un cetonitrilo de fórmula (III)



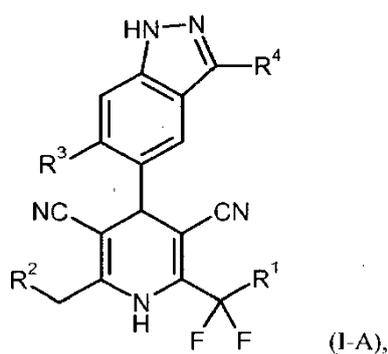
- 5 o un enolato sódico del mismo, en la que R<sup>2</sup> tiene el significado indicado en las reivindicaciones 1 a 3, en presencia de un ácido, una combinación ácido/base y/o un agente deshidratante, dando un compuesto de fórmula (IV)



- 10 en la que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> tienen los significados indicados en las reivindicaciones 1 a 3, y el último se condensa después con un enamionitrilo de fórmula (V)



en la que R<sup>1</sup> has tiene el significado indicado en las reivindicaciones 1 a 3, dando el compuesto de fórmula (I-A)



15

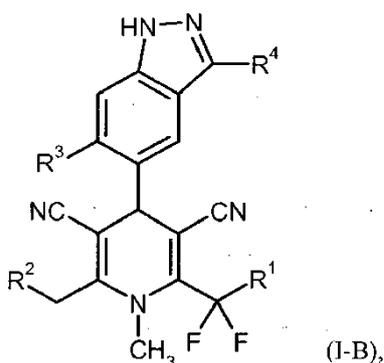
en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> tienen los significados indicados en las reivindicaciones 1 a 3, seguido opcionalmente por N-metilación de dihidropiridina usando un compuesto de fórmula (VI)



en la que

- 20 X representa un grupo saliente tal como halógeno, mesilato, triflato, tosilato o sulfato.

en presencia de una base, dando el compuesto de fórmula (I-B)



en la que  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  tienen los significados indicados en las reivindicaciones 1 a 3, y seguido opcionalmente, cuando sea adecuado, por (i) separación de los compuestos (I-A) y (I-B) en sus respectivos enantiómeros y/o diaestereómeros, usando preferentemente procedimientos cromatográficos y/o (ii) conversión de los compuestos (I-A) y (I-B) en sus respectivos hidratos o solvatos mediante tratamiento con los correspondientes disolventes.

- 5
5. El compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para usar en el tratamiento o prevención de enfermedades.
- 10
6. Uso de un compuesto como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un trastorno de proliferación celular.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el trastorno de proliferación celular es cáncer.
8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, que además comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el agente terapéutico adicional es un agente antitumoral.
- 20
11. La composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para usar en el tratamiento o prevención de un trastorno de proliferación celular.