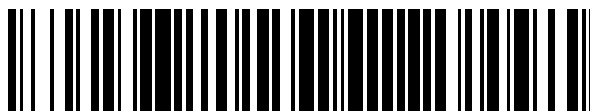


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 777**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11771312 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2625175**

54 Título: **(R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol cristalino y su uso como inhibidor de FGFR**

30 Prioridad:

05.10.2010 US 389911 P

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

08.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DISEROD, BENJAMIN ALAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 558 777 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

(R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol cristalino y su uso como inhibidor de FGFR

5 El factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) ha sido reconocido como un mediador importante de muchos procesos fisiológicos, tales como morfogénesis durante el desarrollo y angiogénesis. La familia del receptor del factor de crecimiento del fibroblasto (FGFR) consiste en cuatro miembros (FGFR1-FGFR4), los cuales son glicoproteínas compuestas de dominios similares a inmunoglobulina (Ig) extracelular, una región de transmembrana hidrófoba y una parte citoplásmica que contiene un dominio tirosina cinasa. El enlace de FGF conduce a la dimerización de FGFR, seguida por autofosforilación del receptor y activación de las rutas de señalización aguas abajo. La activación del receptor es suficiente para el reclutamiento y la activación de patrones de señalización específicos aguas abajo que participan en la regulación de diversos procesos, tales como crecimiento celular, metabolismo celular y supervivencia celular. De esta manera, la ruta de señalización FGF/FGFR tiene efectos pleiotrópicos en muchos procesos biológicos críticos para la proliferación de células tumorales, migración, invasión y angiogénesis.

15 Los vinil indazoles se conocen en la técnica para el tratamiento del cáncer. Véanse por ejemplo, los documentos W0200210137 y W02003101968. Los inhibidores de FGFR se conocen también en la técnica. Véase por ejemplo, el documento W02002022598.

El documento PCT/US2010/033487 divulga una forma amorfa de (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol que es pobremente cristalina y es útil como un inhibidor de FGFR.

20 La presente invención proporciona un ((R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol cristalino monohidrato que es un potente inhibidor de FGFR y puede ofrecer propiedades ventajosas con relación a la forma previa de propiedades superiores de manipulación de sólidos a gran escala, facilidad de purificación mediante cristalización y estabilidad termodinámica bajo condiciones de procesamiento y almacenamiento farmacéutico.

25 La presente invención proporciona también (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol cristalino monohidrato caracterizado por un patrón de difracción de rayos-X en polvo (radiación Cu, $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$) que comprende un pico a 14,65, y uno o más picos en 3,54, 12,51 o 19,16 ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

30 Se describe un procedimiento de tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer hepático, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de células renales, glioblastoma, y cáncer testicular en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero en necesidad de dicho tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto o sal de la presente invención.

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

35 La presente invención proporciona también un compuesto o sal de la presente invención para su uso en terapia. Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un compuesto o sal de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Además, la presente invención proporciona un compuesto o sal de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En particular, estos cánceres se seleccionan de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple AML, cáncer hepático, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de células renales, glioblastoma, y cáncer testicular. Más particularmente, los cánceres se seleccionan de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer hepático, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de células renales, glioblastoma y cáncer testicular. Más particularmente el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas. Más particularmente, el cáncer es cáncer gástrico. Más particularmente, el cáncer es mieloma múltiple. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer hepático, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de células renales, glioblastoma, y cáncer testicular que comprende un compuesto o sal de la presente invención como un ingrediente activo.

El lector con conocimientos en la materia entenderá que todos los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales. Los compuestos de la presente invención son aminas y, por consiguiente, reaccionan con cualquiera de entre una serie de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Dichas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien

conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo. P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHAWiley-VCH, 2008); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, Enero de 1977.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "aislado" significa (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol cristalino que es 99% puro

Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados esencialmente tal como se ilustra en las preparaciones y los ejemplos siguientes. El nombramiento de las preparaciones y los ejemplos siguientes se realiza usando la característica de nombramiento Struct=Nombre en ChemDraw® Ultra 10.0.

Preparación 1

10 1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol

A un matraz de fondo redondo, de 3 cuellos, de 12 l, se añade tetrahidrofurano (THF, 3 l) y diisopropilamina (DIPA, 315 ml, 2,24 mol) y se enfría a -78°C. Se añade lentamente n-butillitio (1,6 M en hexanos, 1.400 ml, 2,24 mol). Una vez completada la adición y una vez que la temperatura se ha establecido a -78°C, se añade lentamente una solución de 3,5-dicloropiridina (296,7 g, 2,00 mol) que forma inmediatamente una solución amarilla que cambia a una suspensión de color óxido. Una vez completada la adición y una vez que la temperatura se ha establecido a -78°C, se añade lentamente acetaldehído (230 ml, 4,05 mol) en THF (600 ml). Se continúa agitando a -78°C. Después de 3 horas, se retira el baño de hielo seco y se comienza a detener la reacción mediante la adición, gota a gota, de cloruro de amonio acuoso saturado (1 l). Se permite que la reacción se caliente a temperatura ambiente (RT) durante la noche con agitación. Se diluye la mezcla con metil-tert-butiléter (MTBE, 2 l), cloruro de amonio acuoso saturado (1 l) y agua (2 l). Se divide y se lava la parte orgánica con cloruro de sodio acuoso saturado (salmuera). Se extrae la fase acuosa con MTBE (1,5 l). Se combinan las capas orgánicas, se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran en vacío. Se purifica el residuo mediante cromatografía en gel de sílice [25% de acetato de etilo (EA) en hexanos] para dar el compuesto del título como un aceite rojo. Rendimiento: 352 g (90%). MS (ES) m/z 192 [M+1]⁺.

Preparación 2

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

Se separa la mezcla de estereoisómeros obtenida en la Preparación 1 en una columna CHIRALPAK® AD-H eluyendo con 90% de heptanos/10% de etanol. El pico 2 es el enantiómero deseado. Para establecer la configuración absoluta se disuelve una muestra del producto en CDCl₃ (concentración final 100 mg/ml). Se obtienen espectros de dicroísmo circular vibracional (VCD) y de infrarrojos (IR) con una resolución de 4 cm⁻¹ usando un espectrómetro ChiralIR FT VCD (BioTools Inc ®) con una celda IR equipada con ventanas BaF₂ y una longitud de trayectoria de 100 mm. Se recopilieron los espectros VCD e IR durante 6 horas con 150 µl de la muestra. Se presentan los datos sin realizar suavizados o procesamientos de datos adicionales. Se obtienen frecuencias vibracionales y absorción e intensidades de VCD optimizando el cóncornero de energía más baja mediante el paquete Gaussian al nivel B3PW91/6-31G^{**} en un agrupamiento Linux, y se simulan los espectros correspondientes usando una anchura de banda Lorentziana de dicroísmo circular vibracional de 6 cm⁻¹. El análisis anterior muestra que el producto es el isómero-S. Rendimiento: 84,37 g (27%). MS (ES) m/z 192 [M+1]⁺.

Preparación 3

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

40 Se disuelve (S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etanol (5,02 g, 26,14 mmol) en diclorometano (DCM, 100 ml) y se enfría el matraz en un baño de hielo. Se añade trietilamina (TEA, 3,5 ml, 25,11 mmol) seguido por la adición, gota a gota, de cloruro de metansulfonilo (2,2 ml, 28,42 mmol). Se retira el baño de hielo y la reacción se deja calentar a RT. Después de 4 horas, la reacción se detiene con agua (100 ml) y se separan las capas. Se extrae la capa acuosa con DCM (50 ml) seguido por 20% de alcohol isopropílico (IPA)/cloroformo (50 ml). Se combinan los extractos orgánicos, se secan sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y se concentran en vacío. Rendimiento: 7,15 g, (100%). MS (ES) m/z 270 [M+1]⁺.

45 Preparación 4

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

50 En un matraz de 3 cuellos, de 1 l, equipado con barra agitadora magnética, manto de nitrógeno y sonda de temperatura interna, se disuelve 2-(2-bromoetoxi)tetrahydro-2H-pirano (34 g, 156 mmol) en acetonitrilo (ACN, 400 ml). Se añade 4-yodopirazol (29,34 g, 149,74 mmol) seguido por carbonato de cesio (73,4 g, 223,02 mmol). Se agita la mezcla a RT durante 18 horas. Se filtra la mezcla de reacción a través de CELITE®, se lava la torta de filtro con ACN y se concentra la parte filtrada a un aceite dorado. Se usa sin purificación adicional. Rendimiento: 47,819 g (99%). MS (ES) m/z 323 [M+1]⁺.

Preparación 5

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

Se carga un recipiente de reacción de 10 l con N,N-dimetilformamida (DMF, 2,50 l), 5-hidroxiindazol (150,20 g, 1,12 mol) y 1H-imidazol (114,35 g, 1,68 mol). Se enfría la mezcla a 0°C y se añade tert-butildimetilclorosilano (253,16 g, 1,68 mol) durante 0,5 horas. Se agita la mezcla a 18°C durante 3 horas. Se añade agua (2,5 l) a la reacción lentamente con un baño de hielo a 5°C para mantener una temperatura interna a aproximadamente 20°C. Se transfiere la mezcla a un embudo separador y se extrae con EA (2 x 2,5 l). Se combinan los extractos y se lavan con agua (3 x 2,5 l) y salmuera. Se secan las soluciones orgánicas sobre sulfato de sodio anhidro, se filtran y evaporan a un aceite rojo. El aceite se pasa a través de una almohadilla de gel de sílice y se eluye con eluyente (del 0% al 30% de EA en hexano) para proporcionar el compuesto del título como un aceite anaranjado que cristaliza. Rendimiento: 300 g (100%). MS (ES) m/z 249 (M+1)⁺.

Preparación 6

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

Se enfría una solución de 5-(tert-butildimetilsililoxi)-1H-indazol (300,00 g, 1,21 mol) en DCM (4,00 l) a 10°C en un recipiente de reactor encamisado de 10 l. A la solución resultante se añade N-yodosuccinimida (298,89 g, 1,33 mol) en porciones durante 0,5 horas. Se agita la mezcla a RT durante 3 horas para proporcionar una conversión completa como lo indica una espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC-MS) y cromatografía de capa delgada (TLC). Se enfría la mezcla a 10°C y se detiene con agua (2,5 l). Se transfiere la mezcla a un embudo separador y se extrae la capa acuosa en DCM (2,5 l). Los extractos orgánicos combinados se lavan con una solución acuosa de tiosulfato de sodio al 10% (5 l) y salmuera. La solución orgánica se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra en vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido anaranjado. Rendimiento: 388 g (90%). MS (ES) m/z 375 (M+1)⁺.

Preparación 7

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

Se enfría una solución de 5-(tert-butildimetilsililoxi)-3-yodo-1H-indazol (387,00 g, 1,08 mol) en DCM (2,50 l) y THF (1,00 l) a 10°C en un recipiente de reactor encamisado de 10 l. A la mezcla resultante se añade ácido metansulfónico (14,0 ml, 216,02 mmol), seguido de 3,4-dihidro-2H-pirano (296 ml, 3,24 mol) durante 0,5 horas, observando una ligera exoterma. La mezcla se agita a RT durante 3 horas. La reacción se enfría a 10°C y se detiene con bicarbonato de sodio acuoso saturado (2 l). La mezcla se diluye con agua (2 l) y la capa acuosa se extrae con DCM (2 l). Los extractos orgánicos combinados se lavan con agua (2 l) y salmuera. La mezcla orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra en vacío. El residuo se eluye a través de una almohadilla de gel de sílice con eluyente (del 0 al 10% de EA/hexanos) para dar el compuesto del título. Rendimiento: 150 g (31%). MS (ES) m/z 459 [M+1]⁺.

Preparación 8

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

Se rocía con nitrógeno una mezcla de 5-(tert-butildimetilsililoxi)-3-yodo-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol (14 g, 30,54 mmol) en DMF (150 ml) en un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 500 ml, equipado con agitador magnético, sonda de temperatura y condensador con septo, durante 10 minutos. A la solución resultante se añade tributilamina (TBA, 6,7 g, 36,1 mmol) y 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (7,0 g, 43,18 mmol) y se continúa rociando durante 10 minutos. A la mezcla resultante se añade cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (0,45 g, 0,63 mmol) y se continúa rociando durante 0,5 horas adicionales. La mezcla se calienta a 95-100°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfría por debajo de 40°C y se carga con 4-yodo-1-(2-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)etil)-1H-pirazol (9,8 g, 30,42 mmol). A la mezcla resultante se añade octahidrato hidróxido de bario (19,3 g, 60,3 mmol) y agua (13 ml) y se continúa rociando durante 10 minutos. Se añade complejo de DCM de cloruro de 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno paladio (II) (1,3 g, 1,56 mmol) a la reacción y se continúa rociando durante 0,5 horas. La mezcla se calienta a 95°C bajo nitrógeno durante 3 horas. La mezcla se diluye con EA y se filtra a través de una almohadilla de Celite®. La almohadilla se lava con salmuera (400 ml) y las capas filtradas se separan. La capa orgánica se lava con salmuera y las capas acuosas combinadas se extraen con EA. Las soluciones orgánicas se combinan y se concentran a un aceite marrón. El aceite se disuelve en DCM (100 ml) y se añade a una almohadilla de gel de sílice. La almohadilla se eluye con eluyente (50% de EA en hexanos seguido de 70% de EA en hexanos) para proporcionar un aceite marrón claro. Se tritura con MTBE (100 ml) para proporcionar el compuesto del título como un sólido. Rendimiento: 5 g (37%). MS (ES) m/z 439 (M+1)⁺.

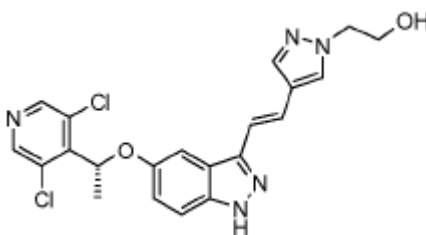
Preparación 9

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

En un matraz de fondo redondo de 250 ml de 3 cuellos, equipado con una sonda de temperatura interna, condensador a reflujo, manto de nitrógeno y barra agitadora magnética, se someten a suspensión (E)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-(2-(2-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)etil)-1H-pirazol-4-il)vinil)-1H-indazol-5-ol (10,0 g, 22,83 mmol) y carbonato de cesio (7,88 g, 23,94 mmol) en ACN (92 ml) y se calienta a 60°C. A la suspensión se añade metansulfonato de (S)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etilo (7,03 g, 26,02 mmol) y se agita durante la noche. La mezcla de reacción se enfría a RT, se filtra y los sólidos se lavan con ACN. El filtrado se concentra y el residuo se purifica mediante cromatografía en gel de sílice (2-4% (2 M amoníaco en metanol)/DCM). Las fracciones del producto se combinan y se concentran en vacío a una espuma blanca. Rendimiento: 12,5 g (86%). MS (ES) m/z 612 [M+1]⁺.

Preparación 10 (forma amorfa)

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



Un matraz de fondo redondo de 250 ml de 3 cuellos, equipado con un embudo de adición, entrada de nitrógeno, sonda de temperatura interna y agitador magnético, se carga con metanol (57 ml) y se enfría en un baño de hielo. A la solución resultante, se añade cloruro de acetilo (20 ml, 281,03 mmol) lentamente a través de un embudo de adición. A la solución se añade 5-((R)-1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-((E)-2-(1-(2-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)etil)-1H-pirazol-4-il)vinil)-1H-indazol (7,1 g, 11,59 mmol) disuelto en metanol (40 ml) mediante un embudo de adición. Una vez completada la adición, se retira el baño de hielo, se calienta a RT y la mezcla se agita durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra en vacío a una espuma amarilla. La espuma amarilla se disuelve en metanol (10 ml) y se añade lentamente a una solución saturada de bicarbonato de sodio (120 ml). La mezcla se agita a RT durante 30 minutos. Se filtra la mezcla, el sólido se lava con agua (100 ml), y se seca bajo vacío. El sólido se recristaliza a partir de EA/metanol/hexanos caliente para dar el compuesto del título como un sólido blanco. Rendimiento: 2,1 g (41%). MS (ES) m/z 444 [M+1]⁺.

Ejemplo 1

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

Se purga un recipiente de reacción con nitrógeno y se carga con (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol y una mezcla de disolvente que consiste en 11% de agua/acetonitrilo. La suspensión resultante se calienta a una temperatura interna de 66- 68°C produciendo una solución. La solución se enfría lentamente a 56-58°C, a continuación se siembra con una suspensión de cristales sembrados en 11% de una mezcla de agua/acetonitrilo y se agita lentamente. La mezcla de reacción se enfría inicialmente a 48-50°C y, a continuación, a 19-20°C. El producto se aísla mediante filtración en presencia de una corriente de nitrógeno con una humedad relativa de al menos el 80% pasando a través de la torta sólida. A continuación, el nivel de humedad en la corriente de nitrógeno es cambiado subsecuentemente al 40% y el secado continúa, resultando en la producción del compuesto del título. Obsérvese que el cristal sembrado se obtiene de manera similar como sigue: Se purga un recipiente de reacción con nitrógeno y se carga con (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol y una mezcla de disolvente que consiste en 11% de agua/acetonitrilo. La suspensión resultante se calienta a una temperatura interna de 70°C produciendo una solución. A continuación, la solución se enfría lentamente, se deja cristalizar, se filtra y se seca. Este compuesto es un potente inhibidor de FGFR y puede tener las propiedades ventajosas con relación a la forma anterior de propiedades superiores de manipulación de sólidos a gran escala, facilidad de purificación mediante cristalización y estabilidad termodinámica bajo condiciones de procesamiento y almacenamiento farmacéutico.

Compuesto del Ejemplo 1, XRPD

El patrón de XRPD se obtiene usando un difractómetro PANalytical X'Pert™ Pro MPD PW3040 Pro, equipado con una radiación CuKα (X = 1,54059 Å (voltaje: 45kV y amperaje: 40 mW)) producida usando una fuente de enfoque fino largo Optix. El espécimen se intercala entre películas de 3 micrómetros de espesor, se analiza en geometría de transmisión, y se hace rotar a 1 revolución por segundo para optimizar las estadísticas de orientación. Antes del análisis, se analiza un espécimen de silicio (material de referencia estándar NIST 640c) para verificar la posición del pico 111 de silicón. Se

5 analiza un patrón Panalytical para este material, y se valoran la orientación preferida y los efectos estáticos de partícula mediante la comparación del patrón de XRPD simulado con un análisis de cristal único. Se usa un espejo de múltiples capas graduado elípticamente para enfocar los rayos-X de Cu Ka de la fuente a través del espécimen y sobre el detector. Los patrones de difracción se obtienen usando un detector sensible a la posición de exploración (X'Celerator) situado a 240 mm del espécimen. Se recogen datos desde 1,01 a 39,99 grados 2θ con un tamaño de paso de 0,017 grados 2θ y una velocidad de exploración de 1,2 grados/min y con una rendija de divergencia de 0,5 grados y una rendija de dispersión de 0,25 grados. Se usa un tope de haz para minimizar el ruido de fondo generado por la dispersión del aire. Se usan rendijas de Soller para los haces incidentes y de difracción para minimizar la divergencia axial. Los picos observados se muestran en la Tabla 1. Se usa un umbral de intensidad del 5%.

10

Tabla 1. Picos observados para el compuesto del Ejemplo 1, XPRD

$^{\circ}2\theta$	Espacio d (Å)	Intensidad (%)
3,54 ± 0,10	24,975 ± 0,726	45
7,08 ± 0,10	12,485 ± 0,179	10
10,62 ± 0,10	8,328 ± 0,079	9
12,51 ± 0,10	7,075 ± 0,057	78
13,00 ± 0,10	6,812 ± 0,053	37
13,60 ± 0,10	6,512 ± 0,048	16
14,18 ± 0,10	6,245 ± 0,044	13
14,65 ± 0,10	6,046 ± 0,041	100
14,97 ± 0,10	5,919 ± 0,040	29
15,49 ± 0,10	5,722 ± 0,037	16
16,24 ± 0,10	5,459 ± 0,034	35
16,59 ± 0,10	5,344 ± 0,032	24
17,06 ± 0,10	5,198 ± 0,030	26
17,76 ± 0,10	4,995 ± 0,028	20
18,49 ± 0,10	4,798 ± 0,026	9
19,16 ± 0,10	4,632 ± 0,024	68
20,37 ± 0,10	4,361 ± 0,021	44
21,67 ± 0,10	4,101 ± 0,019	8
21,89 ± 0,10	4,061 ± 0,018	8
22,17 ± 0,10	4,010 ± 0,018	22
23,02 ± 0,10	3,863 ± 0,017	54
24,33 ± 0,10	3,659 ± 0,015	15

(Cont.)

25,25 ± 0,10	3,528 ± 0,014	27
25,93 ± 0,10	3,436 ± 0,013	49
26,16 ± 0,10	3,406 ± 0,013	16
26,77 ± 0,10	3,331 ± 0,012	10
27,23 ± 0,10	3,275 ± 0,012	15
28,25 ± 0,10	3,159 ± 0,011	10
28,59 ± 0,10	3,123 ± 0,011	11
29,56 ± 0,10	3,022 ± 0,010	13

De esta manera, una muestra preparada apropiadamente del Ejemplo 1 puede ser caracterizada por un patrón de difracción de rayos-X usando radiación $\text{CuK}\alpha$, que tiene picos de difracción (valores 2-teta) según se describe en la Tabla 1 y, en particular, que tiene picos en 14,65 en combinación con uno o más de los picos en 3,54, 12,51 y 19,16: y más particularmente que tiene un pico en 14,65; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,1 grados, más preferiblemente de 0,01 grados.

La regulación aberrante de la ruta FGF/FGFR ha estado implicada en muchas formas de malignidades humanas. Los FGFRs y FGFs están frecuentemente sobre-expresados en numerosos cánceres, y su expresión se correlaciona frecuentemente con un mal pronóstico. Las mutaciones activadoras en el dominio cinasa de FGFR se han encontrado en varios tipos de tumores, incluyendo mama, NSCLC, vejiga, gástrico, próstata, colon y mieloma múltiple. La amplificación genómica del locus FGFR se detectó también en muchos pacientes con cáncer de mama, gástrico y de pulmón. La sobre-expresión de FGFRs o FGFs se ha encontrado también en muchos tipos diferentes de tumores tales como cáncer de vejiga, mieloma múltiple, próstata y de pulmón. Otros cánceres que podrían beneficiarse de la terapia inhibitoria de la ruta de la familia del FGFR incluyen AML, cáncer hepático, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de células renales, glioblastoma y cáncer testicular. Además de sus papeles en la formación y progreso del tumor, los FGFs y FGFRs son también reguladores clave de angiogénesis, especialmente durante el crecimiento del tumor. El eje FGF/FGFR también desempeña un papel importante en el aumento de otras células estromales del tumor, tales como fibroblastos asociados con cáncer. La regulación ascendente de FGFs conduce también a resistencia a quimioterapias anti-angiogénicas y otras quimioterapias. Finalmente, los inhibidores de molécula pequeña de FGFRs han demostrado actividades anti-tumorales en varios modelos de tumor preclínicos y están siendo explorados en la clínica. Tomada en su conjunto, la ruta FGF/FGFR es esencial para varios procesos celulares importantes en células cancerígenas. Por estas razones, las terapias basadas en usar como objetivo la señalización de FGFRs/FGF pueden afectar tanto a las células tumorales directamente como a la angiogénesis tumoral.

La Preparación 10 es ensayada esencialmente tal como se describe a continuación en los ensayos siguientes: Ensayo de Enzima FGFR1 (unión a filtro), el Ensayo de Enzima FGFR3 (unión a filtro), ensayo de p-ERK inducido por FGF9 basado en células RT-112 (en presencia de BSA) y la detección AlphaScreen SureFire de fosforilación ERK (Thr202/Tyr204) en ensayos basados en células de las Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana (HUVEC). Estos ensayos demuestran que la Preparación 10 es un inhibidor de la ruta de la familia FGFR y tiene actividad anti-cancerígena. De esta manera, los resultados con la forma amorfa de (R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5- dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol son indicativos de los resultados con el compuesto de la presente invención. Las formas cristalinas del compuesto son todavía ventajosas debido a que pueden ofrecer las propiedades relativas a la forma anterior de propiedades superiores de manipulación de sólidos a gran escala, facilidad de purificación mediante cristalización y estabilidad termodinámica bajo condiciones de procesamiento y almacenamiento farmacéutico.

35 Ensayo de Enzima FGFR1 y FGFR3 (unión a filtro)

Se incuba cinasa FGFR1 o FGFR3 (0,15 ng/ μ l de FGFR1 humano o 0,32 ng/ μ l de FGFR3 humano) en 50 μ l de un tampón que contiene ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetan-sulfónico (HEPES) 10 mM pH 7,5, tris(hidroxi-metil)aminometano (Tris-HCl) 8 mM, pH 7,5, ditiotreitil (DTT) 5,0 mM, trifosfato de adenosina (ATP) 10,0 μ M, MnCl_2 10 mM, NaCl 150 mM, 0.01% de TRITON® X-100, 0,5 μ Ci de ^{32}P -ATP y 0,05 μ g/ μ l de Poly(Glu-Tyr). La reacción se lleva a cabo en un volumen de 50 μ l a RT durante 30 minutos y, a continuación, se detiene añadiendo 130 μ l de H_3PO_4 al 10%. La reacción (120 μ l) se transfiere a una placa de filtro de fibra de vidrio de 1,0 μ m de 96 pocillos, se incuba a RT durante 20-30 minutos y, a continuación, se lava 3x en un dispositivo Zoom TITERTEK® con 0,5% de H_3PO_4 . Los pocillos

se secan en aire antes de la adición de 40 µl de MicroScint™20 (Packard) y, a continuación, se cuentan en un contador Wallac Micobeta. Para la inhibición del compuesto, el compuesto se proporciona como pilas de 10 mM en dimetil sulfóxido (DMSO). El compuesto es diluido 1:3 en serie en 20% de DMSO para crear una curva de concentración - respuesta de 10 puntos y se diluye 1:5 (de 20 µM a 0,001 µM final en 4% de concentración final de DMSO) en la placa de reacción antes de la adición de la mezcla de reacción en la placa de filtro para determinar la actividad del compuesto. Los pocillos de control contienen 4% de DMSO solamente mientras se establece la línea base mediante los pocillos de control que contienen ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 0,1 M. Los valores de porcentaje de inhibición para cada una de las 10 concentraciones se calculan a partir de los pocillos de control en cada placa y los datos de concentración-respuesta de 10 puntos son analizados subsecuentemente usando el software ActivityBase (IDBS) usando una ecuación logística de 4 parámetros y los valores IC₅₀ absolutos se estiman a partir del ajuste de curva resultante. Los ensayos de enzima FGFR1 y FGFR3 tienen proporciones significativas mínimas (MSR) para el IC₅₀ estimado de 1,38 y 1,47, respectivamente. Se estima que los resultados IC₅₀ para la Preparación 10 para FGFR1 y FGFR3 en estos ensayos son 0,0077 y 0,0064 µM, respectivamente. Estos datos demuestran que la Preparación 10 es un potente inhibidor de enzima FGFR1 y FGFR3.

p-ERK inducido por FGF9 con BSA

Se siembran células de carcinoma de vejiga humana RT112 a una densidad de 5.000 células por pocillo en 100 µl de RPMI 1640 (Gibco 11875-085) suplementadas con 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco 10082-147) y 1% de una solución de penicilina/estreptomicina (Gibco 15140-122) en placas de 96 pocillos CELLBIND® (Coming 3340) y se incuban durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente, el medio de crecimiento se retira y se reemplaza con 100 µl de RPMI 1640 suplementado con 20 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). Después de 3 horas de incubación a 37°C, 20 µl de compuestos diluidos serialmente 3x en RPMI 1640 con 20 mg/ml de BSA en 6% de DMSO se añaden a cada pocillo. Esto proporciona una curva de dosis respuesta de 10 puntos que varía desde 10 – 0,005 µM en 1% de DMSO. La incubación se continúa durante 1 hora a 37°C. Las células son estimuladas con 50 µl de una solución FGF9 de 50 µg/ml (R&D Systems 273-F9) en RPMI libre de suero para dar una concentración final de 500 ng/ml de FGF9. Las células son fijadas mediante la adición de 30 µl de una solución de formaldehído al 25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (3,7% de concentración final de formaldehído), y se incuban durante 30 minutos a RT. Las células se lavan 3x con PBS, seguido por la adición de 100 µl de metanol frío y se incuban durante 30 minutos a -20°C. El metanol se retira y las células se tratan con PBS que contiene 0.1% de TRITON® X-100 (PBST), se lavan 3x con PBS y se incuban durante 15 minutos a RT. A continuación, las células se incuban durante la noche a 4°C con agitación suave en 50 µl de una dilución 1:400 del anticuerpo primario MAPK p-p44/42 (señalización celular 9101S) en PBS suplementado con 2% de BSA, 0,01% de cóctel 1 inhibidor de fosfatasa (Sigma P2850), 0,01% de cóctel 2 inhibidor de fosfatasa (Sigma P5726), y 0,01% de cóctel inhibidor de proteasa (Sigma P8340). A la mañana siguiente, las placas se lavan 2x con PBST y 2x con PBS, seguido por una incubación durante 1 hora a RT en la oscuridad en 80 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario H+L IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11034) en PBS con 1% de BSA y 0,1% de cóctel 1 inhibidor de fosfatasa, 0,01% de cóctel 2 inhibidor de fosfatasa y 0,01% de cóctel inhibidor de proteasa. Las células se lavan 3x con PBS, seguido por la adición de 100 µl de una dilución 1:200 de yoduro de propidio (PI) (Molecular Probe P-3566) en PBS y, a continuación, se incuban en la oscuridad durante 1 hora. Se identifican las células p-ERK positivas y las células totales por pocillo con el dispositivo ACUMEN EXPLORER™ (TTP LabTech Ltd) usando filtro óptico de 500-530 nM y 575-640 nM para Alexa 488 y PI, respectivamente. La intensidad media total para pERK/pocillo usando los valores Alexa 488 se convierten subsecuentemente a porcentaje de inhibición usando los valores obtenidos de los ensayos de control MIN (10 µM de compuesto de control positivo en DMSO) y MAX (DMSO solo) en la misma placa. Los valores de porcentaje de inhibición y los datos de respuesta de concentración de 10 puntos son analizados subsecuentemente usando una ecuación de respuesta a dosis sigmoidal de 4 parámetros y los valores IC₅₀ relativos se estiman a partir de la curva resultante. El ensayo de p-ERK inducido por FGF9 con BSA tiene una Proporción Significativa Mínima (MSR) para el IC₅₀ estimado de 2,7. Se estima que el IC₅₀ para la Preparación 10 en este ensayo es de 0,0004 µM. Estos datos demuestran que la Preparación 10 es un potente inhibidor de la fosforilación ERK inducida por FGF9 en células de cáncer humano.

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

El efecto del compuesto sobre la inhibición del receptor 1 de FGF se mide supervisando la fosforilación de ERK (pERK) en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento del fibroblasto básico en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Los niveles de pERK formados se miden usando el sistema ALPHASCREEN® SUREFIRE® (TGR Biosciences, TGRES50K). Este es un formato de ensayo homogéneo que utiliza la inmunocaptura en sándwich del analito fosforilado seguido por la detección usando perlas ALPHASCREEN® (Perkin Elmer) revestidas de anticuerpo para generar una señal amplificada.

Las células HUVEC se recuperan y se mantienen en medio de crecimiento que consiste en medio basal de células endoteliales (Clonetics, CC-3132) suplementado con 10% de FBS 0,4% de extracto de cerebro bovino, 0,1% de hidrocortisona, 0,1% de anfotericina-B de sulfato de gentamicina y 0,1% de factor de crecimiento epidermal, recombinación humana hasta el paso 7. Para el ensayo, las células se recolectan mediante procedimientos estándar y, a

continuación, se cuentan. Las células (20.000/pocillo) se colocan en placas en 100 µl de medio de crecimiento en placas revestidas de Poli-D-lisina de 96 pocillos (BD, 354640). Las placas se incuban durante la noche a 37°C, 5% de CO₂.

5 En el día del ensayo, las células son desprovistas de suero en 100 µl de medio EBM (célula endotelial basal) que contiene 1,5% de FBS y 20 mg/ml de BSA durante 3 horas a 37°C, 5% de CO₂, a continuación, son tratadas con 20 µM de compuesto diluido en serie 3x en medio de inanición durante 1 hora a 37°C. Esto proporciona una curva concentración-
10 respuesta de 10 puntos que varía entre 10-0,005 µM en 1% de DMSO. Después de 1 hora de tratamiento con compuesto, las células son estimuladas con 50 µl de b-FGF (Sigma, F0291, concentración final de b-FGF de 50 ng/ml) a 37°C durante 15 minutos. En los pocillos que contienen las células y 50 µl de estimulador de b-FGF proporcionan la señal MAX, y células con 10 µM de compuesto de control positivo y 50 µl de estimulador b-FGF como MIN. A continuación, el medio se retira y se añaden 50 µl de tampón de Lisis 1x SUREFIRE® (Componente de Kit TGR Biosciences SUREFIRE®)/pocillo y la incubación se continua a RT durante 10 minutos con agitación suave. Para detección de pERK, se transfieren 6 µl de lisado y 10 µl de mezcla de reacción (60 partes de tampón de reacción/10 partes de tampón de activación/0,6 partes de cada una de las perlas donantes yceptoras, Perkin Elmer, 6760617R) a una proxiplaca de 384 pocillos (Perkin Elmer, 6006280). La placa se sella e incuba a RT durante 2 horas con agitación suave y, a continuación, se lee en el lector de placa Perkin Elmer EnVision equipado con un TurboModule usando ajustes ALPHASCREEN® estándar (Ex_{680nm} y EM_{520-620nm}). Los datos de emisión se convierten a porcentaje de inhibición determinado a partir de los controles MAX (DMSO solo) y MIN (10 µM de compuesto de control positivo en DMSO) en cada placa y los datos de concentración de compuesto de diez puntos son ajustados, a continuación, a una ecuación logística de cuatro parámetros usando ACTIVITYBASE® 4.0 y se estima el IC₅₀. La detección ALPHASCREEN® SUREFIRE® del ensayo de fosforilación ERK ((Thr202/Tyr204) tiene una Proporción Significativa Mínima (MSR) para el IC₅₀ de 2,1. Se estima que el IC₅₀ de la Preparación 10 en este ensayo es de 0,0006 µM. Estos datos demuestran que la Preparación 10 es un potente inhibidor de fosforilación de ERK inducida por bFGF en células endoteliales umbilicales humanas.

25 El compuesto de la presente invención es formulado preferiblemente como una composición farmacéutica administrada mediante una diversidad de rutas. Más preferiblemente, dichas composiciones son para administración oral o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas y dichos procedimientos para preparar las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo., REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (D. Troy, et al., eds., 21° ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

30 El compuesto de la presente invención es generalmente efectivo en un amplio intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, las dosificaciones diarias normalmente están incluidas en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo indicado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis todavía más grandes sin causar ningún efecto secundario peligroso y, por lo tanto, el intervalo de dosificación anterior no pretende limitar, en modo alguno, el ámbito de la invención. Se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente será determinada por un especialista, en vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición a tratar, la ruta de administración elegida, el compuesto o los compuestos reales administrados, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. ((R)-(E)-2-(4-(2-(5-(1-(3,5-dicloropiridin-4-il)etoxi)-1H-indazol-3-il)vinil)-1H-pirazol-1-il)etanol cristalino monohidrato.
2. Compuesto según la reivindicación 1, que es aislado.
- 5 3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el compuesto está **caracterizado por** el patrón de difracción en polvo de rayos-X (radiación Cu, $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$) que comprende un pico en $14,65^\circ$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
4. Compuesto según la reivindicación 3, que comprende además un pico en $3,54^\circ$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
5. Compuesto según la reivindicación 3 o reivindicación 4, que comprende además un pico en $12,51^\circ$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende además un pico en $19,16^\circ$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).
- 10 7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.