

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 776**

51 Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2014** **PCT/IB2014/061484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014** **WO14184778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2014** **E 14728655 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 2997022**

54 Título: **Derivado de pirimidin-4-il-oxi-1H-indol-1-carboxamida y su uso**

30 Prioridad:

17.05.2013 US 201361824464 P

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

12.02.2019

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

GLAENZEL, ULRIKE y

NUFER, ROBERT

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 699 776 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

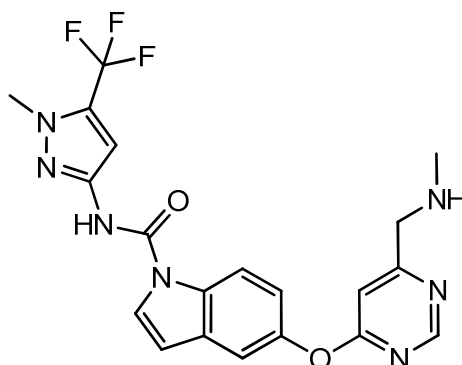
Derivado de pirimidin-4-il-oxi-1H-indol-1-carboxamida y su uso

Campo de la Invención

Esta invención se refiere a un análogo de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida como se define en la reivindicación 1. En particular, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden este análogo, así como al análogo para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por una proteína quinasa cuya enfermedad es causada por neovascularización, por ejemplo, en la forma de enfermedades dependientes del receptor VEGF-R.

Antecedentes de la Invención

El documento Número WO2010/066684, la divulgación relevante de la cual se incorpora a la presente como referencia, divulga una serie de carboxamidas heterobíciclicas como inhibidores para las quinasas. De conformidad con lo anterior, ahora se ha encontrado que estos compuestos muestran inhibición de un número de proteínas quinasa. Los compuestos, descritos en la Publicación Internacional Número WO2010/066684, en especial muestran inhibición de una o más de las siguientes proteínas quinasa: EphB4, c-Abl, Bcr-Abl, c-Kit, las quinasas Raf tal como en especial B-Raf, el proto-oncogén reconfigurado durante la transfección (RET), los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs), Lck, Hck, y más especialmente los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-Rs) tales como en particular VEGF-R1 y VEGF-R2. Los compuestos además también inhiben los mutantes de estas quinasas. En vista de estas actividades, los compuestos descritos en la Publicación Internacional Número WO2010/066684 se pueden utilizar para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la actividad especialmente aberrante o excesiva de estos tipos de quinasas, en especial aquéllos mencionados. Un compuesto particular de esta clase es la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, la cual se puede obtener en la forma de la base libre o como una sal de clorhidrato. La estructura de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida se muestra a continuación:



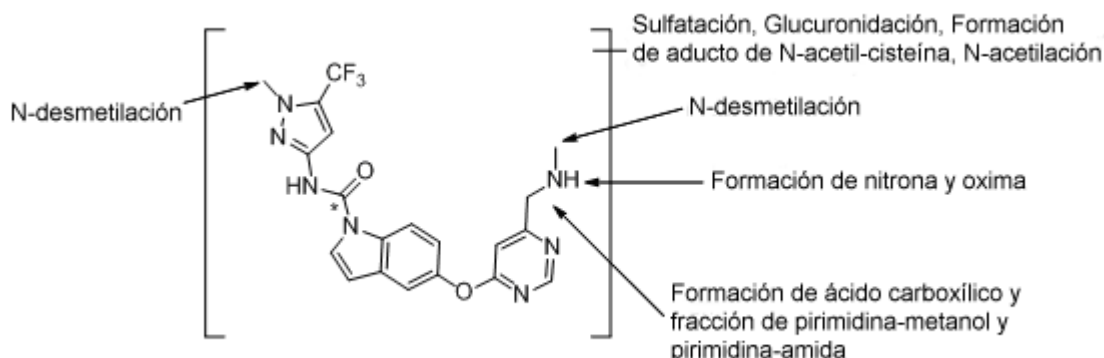
El documento WO 2010/066684 A2 muestra compuestos y un género de compuestos con utilidad en el tratamiento de condiciones mediadas por proteína quinasa tales como enfermedades dependientes del receptor VEGF-R, sin incluir los N-óxidos.

El documento WO 01/02369 A2 divulga que la metabolización de un API puede dar lugar a un metabolito farmacéuticamente activo.

A.-C. Dubbelman et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology 70 (5), 2012, páginas 653-663, muestra que la N-oxidación es una posible biotransformación, al igual que Kimura et al, Biochemical Pharmacology 34, 1985, páginas 3375-3377.

Resumen de la Invención

Se sabe que la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida se metaboliza por medio de transformaciones metabólicas caracterizadas por las siguientes reacciones:



Las reacciones metabólicas incluyen:

- Formación de una nitrona y oxima,
- Formación de un ácido pirimidin-carboxílico y pirimidin-metanol,
- 5 - Formación de una fracción de pirimidin-amida,
- Desmetilación de la fracción de metil-5-trifluoro-metil-pirazol,
- Desmetilación de la fracción de metil-amino-metil-pirimidina,
- Formación de un aducto de N-acetil-cisteína,
- N-acetilación,

- 10 - Sulfatación,
- Glucuronidación,

- Ciertos metabolitos adicionales se generan a través de las reacciones del metabolismo *in vitro* e *in vivo* y discutidas más adelante.

- 15 Ahora se han identificado y caracterizado ciertos análogos de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida. Estos análogos son nuevos agentes potenciales para el tratamiento de enfermedades oftálmicas, tales como degeneración macular relacionada con el envejecimiento.

- 20 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una forma aislada de cualquier metabolito, o a una sal del mismo, de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, y a composiciones farmacéuticas, métodos de tratamiento, y usos de las mismas.

La divulgación, meramente para propósitos de referencia, se refiere además a los métodos para la elaboración de sales y polimorfos de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, así como a composiciones farmacéuticas, métodos de tratamiento, y usos de las mismas.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1 ilustra los patrones de difracción en polvo de rayos-X de la Forma A de la sal de HCl de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

La Figura 2 ilustra la calorimetría de exploración diferencial (DSC) de la Forma A de la sal de HCl de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina.

- 30 La Figura 3 ilustra los patrones de difracción en polvo de rayos-X de la Forma B de la sal de HCl de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

La Figura 4 ilustra la calorimetría de exploración diferencial (DSC) de la Forma B de la sal de HCl de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina.

La Figura 5 ilustra los patrones de difracción en polvo de rayos-X de la Forma A de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

La Figura 6 ilustra la calorimetría de exploración diferencial (DSC) de la Forma A de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina.

Divulgación de la Invención

5 Por consiguiente, la presente divulgación, meramente para propósitos de referencia, se refiere a los siguientes compuestos, los cuales son análogos de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, formados mediante el metabolismo de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida en los animales, en el hombre, y/o en ensayos celulares *in vitro*:

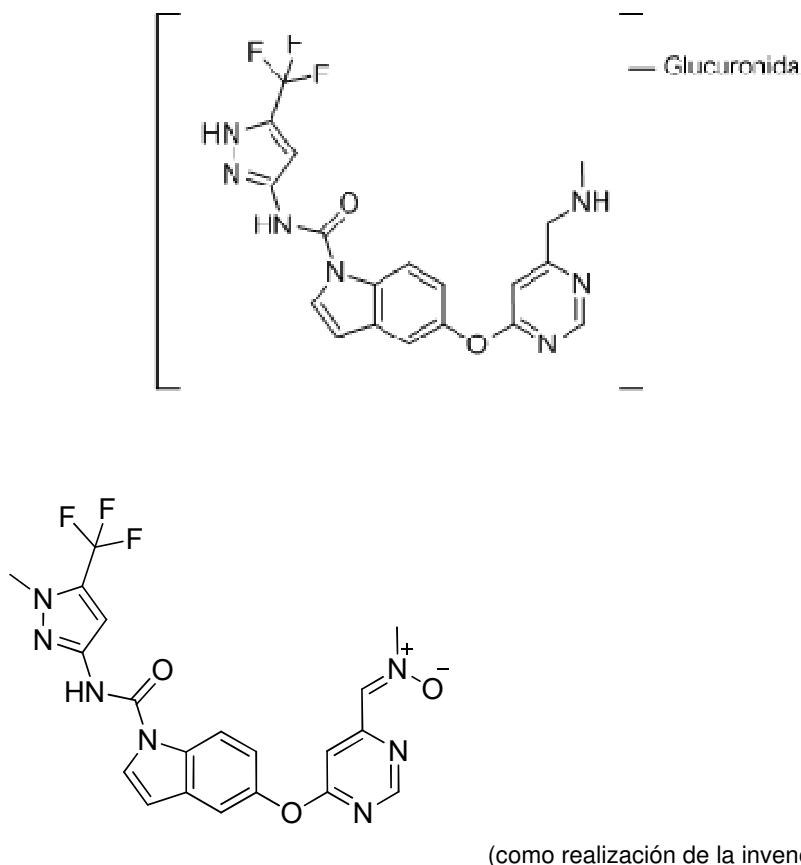
10 En los compuestos que se encuentran más adelante, el cuadro alrededor de una parte del compuesto está etiquetado con "oxigenación" para indicar que en alguna parte a lo largo de la longitud de la región indicada del compuesto hay un oxígeno adicional, por ejemplo, N-óxido o un grupo hidroxilo.

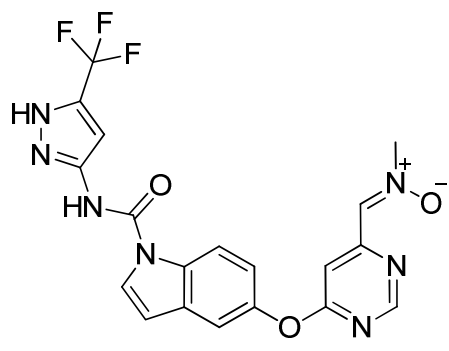
15 En los compuestos que se encuentran más adelante, el cuadro alrededor del compuesto está etiquetado con "Glucuronida" para indicar que en alguna parte a lo largo de la longitud del compuesto hay una transferencia de un ácido glucurónico hacia alguna parte de la molécula, es decir, el producto es la transferencia del componente de ácido glucurónico del UDP-ácido glucurónico hacia una parte de la molécula de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

20 En los compuestos que se encuentran más adelante, el cuadro alrededor del compuesto está etiquetado con "Sulfatación" para indicar que en alguna parte a lo largo de la longitud del compuesto hay una transferencia de un ácido sulfúrico hacia alguna parte de la molécula, es decir, el producto es la transferencia del componente ácido sulfúrico mediante PAPS (3'-fosfo-adenosina-5'-fosfosulfato) hacia una parte de la molécula de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

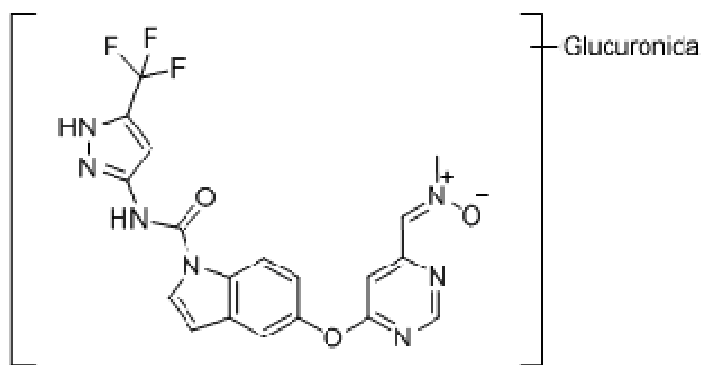
25 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una forma aislada del metabolito definido en la reivindicación 1, y la divulgación, meramente para propósitos de referencia, también se refiere a cualquier otro metabolito, o a una sal del mismo, de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

En una segunda realización, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, se refiere al metabolito, o una sal del mismo, de acuerdo con la primera realización, en donde el metabolito se selecciona a partir de:

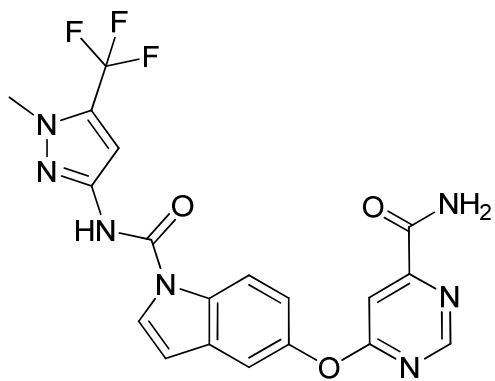




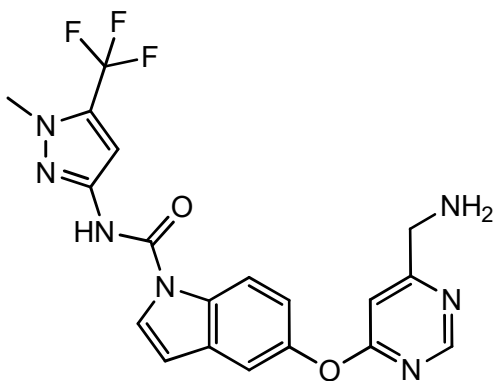
;



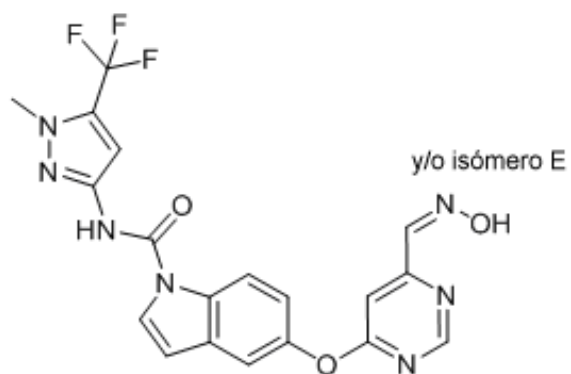
;



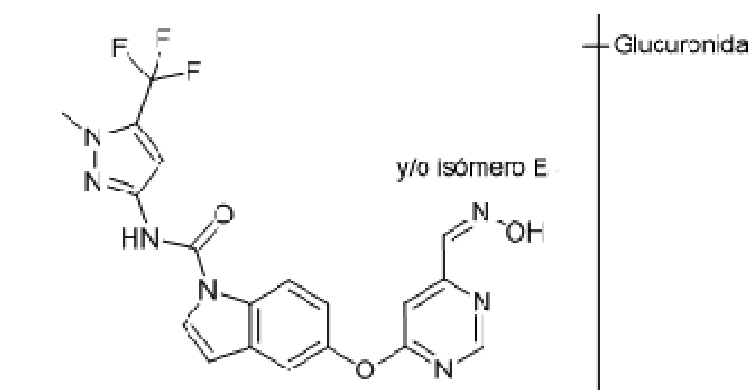
;



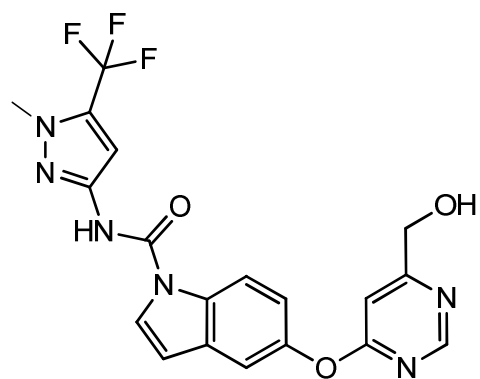
;



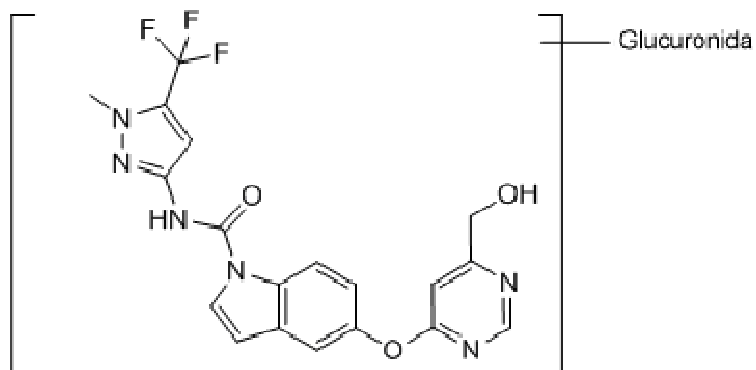
;



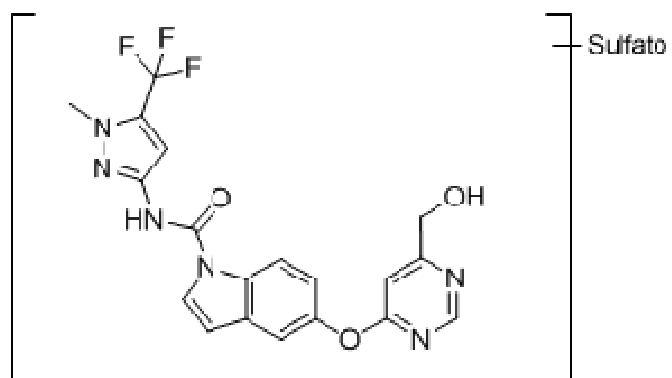
;



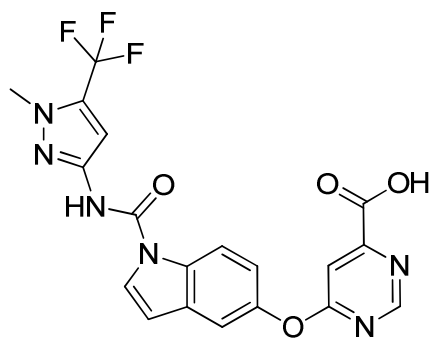
;



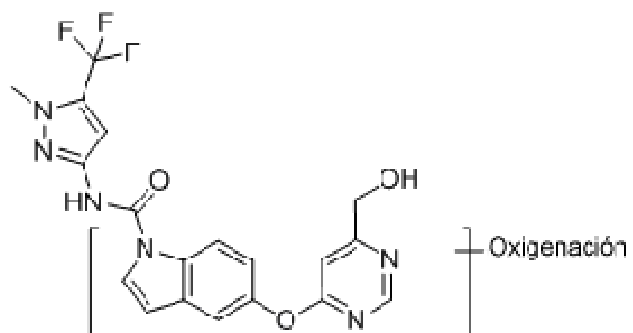
;



;

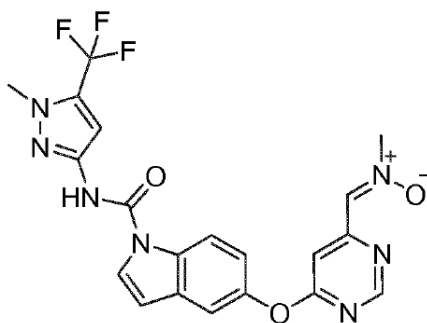


M16; y

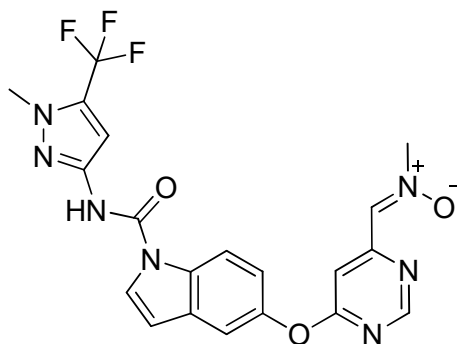


M18.

En una realización específica, la invención es el metabolito, o sal del mismo, de acuerdo con la primera realización en donde el metabolito es:



5 donde el metabolito es:



En otra realización, la invención es una formulación farmacéutica que comprende el metabolito de la realización específica anterior, o una de sus sales, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe un método para tratar una enfermedad neovascular ocular en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el metabolito de las realizaciones primera, segunda y específica o una sal del mismo al paciente en necesidad de terapia.

En aún una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe un uso de un metabolito de una cualquiera de las realizaciones primera, segunda y específica, o una sal del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mediado por una proteína quinasa, especialmente proteína 15 tirosina quinasa, más especialmente enfermedades dependientes del receptor VEGF-R.

En aún una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, f describe una forma cristalina de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida, en particular dicha forma cristalina que comprende la Forma A de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida, en particular las realizaciones de forma cristalina que consisten esencialmente en la Forma A, por ejemplo la forma A está en forma sustancialmente pura.

25 Dicha forma cristalina se caracteriza en particular por un patrón de difracción en polvo de rayos X que comprende cuatro o más valores 2θ seleccionados del grupo que consiste en $6.391 \pm 0.2^\circ$, $8.6 \pm 0.2^\circ$, $9.532 \pm 0.2^\circ$, $10.333 \pm 0.2^\circ$, $11.74 \pm 0.2^\circ$, $12.691 \pm 0.2^\circ$, $13.486 \pm 0.2^\circ$, $14.767 \pm 0.2^\circ$, $15.105 \pm 0.2^\circ$, $15.767 \pm 0.2^\circ$, $16.571 \pm 0.2^\circ$, $16.973 \pm 0.2^\circ$, $17.39 \pm 0.2^\circ$, $17.986 \pm 0.2^\circ$, $18.854 \pm 0.2^\circ$, $19.427 \pm 0.2^\circ$, $19.99 \pm 0.2^\circ$, $20.472 \pm 0.2^\circ$, $20.993 \pm 0.2^\circ$, $22.593 \pm 0.2^\circ$, $23.166 \pm 0.2^\circ$, $24.012 \pm 0.2^\circ$, $24.413 \pm 0.2^\circ$, $25.212 \pm 0.2^\circ$, $25.788 \pm 0.2^\circ$, $26.174 \pm 0.2^\circ$, $26.974 \pm 0.2^\circ$, $27.245 \pm 0.2^\circ$, $28.231 \pm 0.2^\circ$, $32.809 \pm 0.2^\circ$, $34.843 \pm 0.2^\circ$ y $38.831 \pm 0.2^\circ$ a una temperatura de aproximadamente 22°C ; más particularmente

30 caracterizada por un patrón de difracción en polvo de rayos X que comprende cinco o más valores 2θ seleccionados

del grupo que consiste en $6.391 \pm 0.2^\circ$, $8.6 \pm 0.2^\circ$, $9.532 \pm 0.2^\circ$, $10.333 \pm 0.2^\circ$, $11.74 \pm 0.2^\circ$, $12.691 \pm 0.2^\circ$, $13.486 \pm 0.2^\circ$, $14.767 \pm 0.2^\circ$, $15.105 \pm 0.2^\circ$, $15.767 \pm 0.2^\circ$, $16.571 \pm 0.2^\circ$, $16.973 \pm 0.2^\circ$, $17.39 \pm 0.2^\circ$, $17.986 \pm 0.2^\circ$, $18.854 \pm 0.2^\circ$, $19.427 \pm 0.2^\circ$, $19.99 \pm 0.2^\circ$, $20.472 \pm 0.2^\circ$, $20.993 \pm 0.2^\circ$, $22.593 \pm 0.2^\circ$, $23.166 \pm 0.2^\circ$, $24.012 \pm 0.2^\circ$, $24.413 \pm 0.2^\circ$, $25.212 \pm 0.2^\circ$, $25.788 \pm 0.2^\circ$, $26.174 \pm 0.2^\circ$, $26.974 \pm 0.2^\circ$, $27.245 \pm 0.2^\circ$, $28.231 \pm 0.2^\circ$, $32.809 \pm 0.2^\circ$, $34.843 \pm 0.2^\circ$ y $38.831 \pm 0.2^\circ$ a una temperatura de aproximadamente 22°C , o con un espectro de difracción de rayos X sustancialmente igual como el espectro de difracción en polvo de rayos X mostrado en la Figura 1.

La forma cristalina de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida en particular tiene un termograma de calorimetría de exploración diferencial (DSC) sustancialmente igual al que se muestra en la Figura 2.

En una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe una composición farmacéutica que comprende la forma cristalina de acuerdo con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe un proceso para hacer la Forma A de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida que comprende las etapas del Ejemplo de referencia 5.

En otra realización, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe una forma cristalina que comprende la Forma B de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida, por ejemplo que consiste esencialmente en la Forma B por ejemplo en donde dicha Forma B está en forma sustancialmente pura; en particular, caracterizado por un patrón de difracción en polvo de rayos X que comprende cuatro o más valores 2θ seleccionados del grupo que consiste en $8.4113 \pm 0.2^\circ$, $8.836 \pm 0.2^\circ$, $12.6789 \pm 0.2^\circ$, $13.5686 \pm 0.2^\circ$, $15.7124 \pm 0.2^\circ$, $16.8248 \pm 0.2^\circ$, $17.3911 \pm 0.2^\circ$, $18.7462 \pm 0.2^\circ$, $20.4248 \pm 0.2^\circ$, $21.072 \pm 0.2^\circ$, $24.126 \pm 0.2^\circ$, $24.6518 \pm 0.2^\circ$, $25.2788 \pm 0.2^\circ$, $26.5327 \pm 0.2^\circ$, $27.726 \pm 0.2^\circ$ y $35.4721 \pm 0.2^\circ$, a una temperatura de alrededor de 22°C ; más particularmente caracterizado por un patrón de difracción en polvo de rayos X que comprende cinco o más valores 2θ seleccionados del grupo que consiste en $8.4113 \pm 0.2^\circ$, $8.836 \pm 0.2^\circ$, $12.6789 \pm 0.2^\circ$, $13.5686 \pm 0.2^\circ$, $15.7124 \pm 0.2^\circ$, $16.8248 \pm 0.2^\circ$, $17.3911 \pm 0.2^\circ$, $18.7462 \pm 0.2^\circ$, $20.4248 \pm 0.2^\circ$, $21.072 \pm 0.2^\circ$, $24.126 \pm 0.2^\circ$, $24.6518 \pm 0.2^\circ$, $25.2788 \pm 0.2^\circ$, $26.5327 \pm 0.2^\circ$, $27.726 \pm 0.2^\circ$ y $35.4721 \pm 0.2^\circ$, a una temperatura de aproximadamente 22°C ; por ejemplo que tiene un espectro de difracción de rayos X sustancialmente igual al espectro de difracción en polvo de rayos X mostrado en la Figura 3.

Dicha forma cristalina de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida, en otra realización de referencia, tiene un termograma de calorimetría de exploración diferencial (DSC) sustancialmente igual al que se muestra en la Figura 4.

En una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe un proceso para hacer la Forma B de clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida que comprende las etapas del Ejemplo de referencia 6.

En otra realización, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe una forma cristalina de N-(1-metil-5-(trifluorometil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metilamino)metil)pirimidin-4-il)oxi)-1H-indol-1-carboxamida, por ejemplo la Forma A, en particular que consiste esencialmente en la Forma A, particularmente en donde dicha Forma A está en forma sustancialmente pura,

en particular, caracterizada por un patrón de difracción en polvo de rayos X que comprende cuatro o más valores 2θ seleccionados del grupo que consiste en $8.664 \pm 0.2^\circ$, $16.595 \pm 0.2^\circ$, $17.423 \pm 0.2^\circ$, $18.017 \pm 0.2^\circ$, $19.448 \pm 0.2^\circ$, $20.002 \pm 0.2^\circ$, $20.468 \pm 0.2^\circ$, $21.071 \pm 0.2^\circ$, $22.649 \pm 0.2^\circ$, $23.215 \pm 0.2^\circ$, $24.468 \pm 0.2^\circ$ y $25.839 \pm 0.2^\circ$, a una temperatura de aproximadamente 22°C , por ejemplo caracterizada por un patrón en polvo de difracción de rayos X que comprende cinco o más valores 2θ seleccionados del grupo que consiste en $8.664 \pm 0.2^\circ$, $16.595 \pm 0.2^\circ$, $17.423 \pm 0.2^\circ$, $18.017 \pm 0.2^\circ$, $19.448 \pm 0.2^\circ$, $20.002 \pm 0.2^\circ$, $20.468 \pm 0.2^\circ$, $21.071 \pm 0.2^\circ$, $22.649 \pm 0.2^\circ$, $23.215 \pm 0.2^\circ$, $24.468 \pm 0.2^\circ$ y $25.839 \pm 0.2^\circ$, a una temperatura de aproximadamente 22°C , por ejemplo con un espectro de difracción de rayos X sustancialmente igual que el espectro de difracción en polvo de rayos X mostrado en la Figura 5.

En otra realización, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe una forma cristalina de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, que tiene un termograma de calorimetría de exploración diferencial (DSC) sustancialmente igual al mostrado en la Figura 6.

En una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe un proceso para la elaboración de la Forma A del clorhidrato de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, el cual comprende los pasos del Ejemplo de referencia 7.

En una realización adicional, la divulgación, meramente para propósitos de referencia, describe un proceso para la elaboración de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-

carboxamida, de acuerdo con el Ejemplo de referencia 8.

"Forma aislada" significa que el compuesto está libre de cualquiera de los componentes que normalmente lo acompañarían cuando se forma metabólicamente *in vivo*. Por ejemplo, está libre de cualquiera materia biológica, tal como los componentes del suero, así como de otros metabolitos de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida formados *in vivo*. De una manera adecuada, el compuesto es en una forma purificada y aislada. "Purificada" significa que el compuesto es de una manera conveniente más del 75 % puro, de una manera más conveniente más del 90 % puro, y de preferencia más del 95 % puro, y de una manera muy preferible más del 98 % puro.

Como se utiliza en la presente, el término "isómeros" se refiere a diferentes compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero que difieren en el arreglo y configuración de los átomos. También como se utiliza en la presente, el término "un isómero óptico" o "un estereoisómero" se refiere a cualquiera de las diferentes configuraciones estereoisoméricas, las cuales pueden existir para un compuesto dado de la presente invención, e incluyen los isómeros geométricos. Se entiende que un sustituyente se puede unir en un centro quiral de un átomo de carbono. Por consiguiente, la invención incluye los enantiómeros, diaestereómeros o racematos del compuesto. "Enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes de espejo que no se pueden superponer una en la otra. Una mezcla de 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término se utiliza para designar una mezcla racémica donde sea apropiado. "Diaestereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes de espejo uno del otro. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema R-S de Cahn-Ingold-Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada átomo de carbono quiral se puede especificar mediante cualquiera de *R* o *S*. Los compuestos resueltos cuya configuración absoluta se desconoce, pueden ser designados con (+) o (-), dependiendo de la dirección (dextrógira o levógira) en que hagan girar la luz polarizada llana en la longitud de onda de la línea de sodio D. Algunos de los compuestos descritos en la presente contienen uno o más centros asimétricos, y por consiguiente, pueden dar lugar a enantiómeros, diaestereómeros, y otras formas estereoisoméricas que se pueden definir, en términos de la estereoquímica absoluta, como (*R*) o (*S*). La presente invención pretende incluir todos los posibles isómeros, incluyendo las mezclas racémicas, las formas ópticamente puras, y las mezclas de intermediarios. Los isómeros (*R*) y (*S*) ópticamente activos se pueden preparar utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver empleando las técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un doble enlace, el sustituyente puede estar en la configuración E o Z. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente de cicloalquilo puede tener una configuración *cis* o *trans*. También se pretende incluir a todas las formas tautoméricas.

Como se utiliza en la presente, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales que conservan la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y, que no son biológicamente o de otra manera indeseables. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o de base en virtud de la presencia de los grupos amino y/o carboxilo, o de grupos similares a los mismos. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y con ácidos orgánicos, por ejemplo, las sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, edisilato, esilato, formato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluoro-fosfato, hibenzoato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metil-sulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato ácido/fosfato diácido, sacarato, estearato, succinato, tartrato, tosilato y trifluoro-acetato. Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, el ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metan-sulfónico, ácido etan-sulfónico, ácido p-toluen-sulfónico, y ácido salicílico. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden formar con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, y aluminio; se prefieren en particular las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las bases orgánicas a partir de las cuales se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas que se presentan naturalmente, aminas cíclicas, y resinas básicas de intercambio de iones, específicamente tales como isopropil-amina, trimetil-amina, dietil-amina, trietil-amina, tripropil-amina, y etanolamina. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto progenitor, una fracción básica o ácida, mediante los métodos químicos convencionales. En términos generales, estas sales se pueden preparar mediante la reacción de las formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, o bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K, o similares), o mediante la reacción de las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Estas reacciones típicamente se llevan a cabo en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En términos generales, se prefieren los medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo, cuando sea practicable. Las listas de las sales adecuadas adicionales se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use"

por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

La presente invención incluye todos los compuestos isotópicamente marcados farmacéuticamente aceptables de la invención, en donde: (1) uno o más átomos son reemplazados por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa usualmente encontrada en la naturaleza, y/o (2) la proporción isotópica de uno o más átomos es diferente de la proporción que se presenta naturalmente.

Los ejemplos de los isótopos adecuados para incluirse en los compuestos de la invención comprenden los isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H , de carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , de cloro, tales como ^{36}Cl , de flúor, tales como ^{18}F , de yodo, tales como ^{123}I y ^{125}I , de nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , de oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , de fósforo, tales como ^{32}P , y de azufre, tales como ^{35}S .

Ciertos compuestos isotópicamente marcados del compuesto de la realización específica, por ejemplo, aquéllos que incorporan un isótopo radioactivo, son útiles en los estudios de distribución de fármacos y/o de sustratos en el tejido. Los isótopos radioactivos de tritio, es decir, ^3H , y de carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito, en vista de su facilidad de incorporación y fáciles medios de detección.

La sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la vida media *in vivo* o requerimientos de dosificación reducida y, por consiguiente, se puede preferir en algunas circunstancias.

La sustitución con isótopos emisores de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en los estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del sustrato por el receptor.

Los compuestos isotópicamente marcados se pueden preparar en términos generales mediante las técnicas convencionales conocidas por los expertos en este campo, o mediante procesos análogos a aquéllos descritos en los Ejemplos y en las preparaciones acompañantes, utilizando reactivos isotópicamente marcados apropiados en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.

Los solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquéllos en donde el solvente de cristalización puede ser isotópicamente sustituido por ejemplo, D_2O , d_6 -acetona, d_6 -DMSO.

Como se utiliza en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensoactivos, antioxidantes, conservadores (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservadores, fármacos, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como serían conocidos por una persona con experiencia normal en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329). Excepto hasta donde cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad del compuesto de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la reducción o inhibición de la actividad de una enzima o de una proteína, o que mitigará los síntomas, aliviará las condiciones, hará más lento o retardará el progreso de la enfermedad, o prevendrá una enfermedad, etc. En una realización no limitante, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es efectiva para: (1) aliviar, inhibir, prevenir y/o mitigar al menos parcialmente una condición, o un trastorno, o una enfermedad (i) mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o por un receptor del mismo, o (ii) asociada con la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la actividad de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o (iii) caracterizada por una actividad anormal del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o de un receptor del mismo; o (2) reducir o inhibir la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o de un receptor del mismo; o (3) reducir o inhibir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o de un receptor del mismo. En otra realización no limitante, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a una célula, o a un tejido, o a un material biológico no celular, o a un medio, es efectiva para reducir o inhibir al menos parcialmente la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o de un receptor del mismo; o para reducir o inhibir al menos parcialmente la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o de un receptor del mismo. El significado del término "una cantidad terapéuticamente efectiva", como se ilustra en la realización anterior para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o un receptor del mismo, se aplica mediante el mismo significado a cualesquiera otras proteínas/péptidos/enzimas relevantes, tales como Ret, PDGFR-alfa y beta, y kkit.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" se refiere a un animal. De preferencia, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (por ejemplo, a seres humanos), reses, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Como se utiliza en la presente, el término "inhibición" o "inhibir" se refiere a la reducción o supresión de una condición, síntoma, o trastorno, o enfermedad dada, o a una disminución significativa en la actividad de la línea base de una actividad o proceso biológico.

Como se utiliza en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno, se refiere, en una realización, a mitigar la enfermedad o el trastorno (es decir, hacer más lento o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mitigar al menos un parámetro físico, incluyendo aquéllos que no puedan ser discernibles por el paciente. En todavía otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico), o ambas. En todavía otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retardar el establecimiento o desarrollo o progreso de la enfermedad o del trastorno.

Como se utiliza en la presente, el término "un", "uno", "el" y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (en especial en el contexto de las reivindicaciones), se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o que sea claramente contradicho por el contexto.

Todos los métodos descritos en la presente, se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente o que sea de otra manera claramente contradicho por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o del lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tales como") proporcionado en la presente, pretende meramente iluminar mejor la invención reivindicada de otra manera.

Los compuestos de la presente invención se obtienen ya sea en la forma libre, como una sal de los mismos.

Cuando están presentes tanto un grupo básico como un grupo ácido en la misma molécula, los compuestos de la presente invención también pueden formar sales internas, por ejemplo, las moléculas zwitteriónicas.

La presente divulgación, meramente para propósitos de referencia, también proporciona pro-fármacos de los compuestos de la presente invención, los cuales se convierten *in vivo* hasta los compuestos de la presente invención. Un pro-fármaco es un compuesto activo o inactivo que se modifica químicamente a través de la acción fisiológica *in vivo*, tal como la hidrólisis, el metabolismo, y similares, hasta un compuesto de esta invención en seguida de la administración del pro-fármaco a un sujeto. La idoneidad y las técnicas involucradas en la elaboración y utilización de los pro-fármacos son bien conocidas por los expertos en la materia. Los pro-fármacos se pueden dividir conceptualmente en dos categorías no exclusivas: pro-fármacos bioprecusores y pro-fármacos portadores. Véase *The Practice of Medicinal Chemistry*, Capítulos 31-32 (Editor: Wermuth, Academic Press, San Diego, Calif., 2001). En términos generales, los pro-fármacos bio-precusores son compuestos que son inactivos o que tienen una baja actividad comparándose con el compuesto de fármaco activo correspondiente, que contienen uno o más grupos protectores y se convierten hasta una forma activa mediante el metabolismo o la solvólisis. Tanto la forma del fármaco activo como cualesquiera productos metabólicos liberados deben tener una toxicidad aceptablemente baja.

Los pro-fármacos portadores son compuestos de fármaco que contienen una fracción de transporte, por ejemplo, que mejoran la absorción y/o el suministro localizado hacia un sitio de acción. Deseablemente para este pro-fármaco portador, el enlace entre la fracción de fármaco y la fracción de transporte es un enlace covalente, el pro-fármaco es inactivo o menos activo que el compuesto de fármaco, y cualquier fracción de transporte liberada es aceptablemente no tóxica. Para los pro-fármacos en donde se pretenda que la fracción de transporte mejore la absorción, típicamente la liberación de la fracción de transporte debe ser rápida. En otros casos, es deseable utilizar una fracción que proporcione una liberación lenta, por ejemplo, ciertos polímeros u otras fracciones, tales como ciclodextrinas. Los pro-fármacos portadores, por ejemplo, se pueden utilizar para mejorar una o más de las siguientes propiedades: mayor lipofilicidad, mayor duración de los efectos farmacológicos, mayor especificidad del sitio, toxicidad y reacciones adversas reducidas, y/o mejora en la formulación del fármaco (por ejemplo, estabilidad, solubilidad en agua, supresión de una propiedad organoléptica o físico-química indeseable). Por ejemplo, se puede aumentar la lipofilicidad mediante la esterificación de: (a) los grupos hidroxilo con ácidos carboxílicos lipofílicos (por ejemplo, un ácido carboxílico que tenga al menos una fracción lipofílica), o (b) los grupos de ácido carboxílico con alcoholes lipofílicos (por ejemplo, un alcohol que tenga al menos una fracción lipofílica, por ejemplo, los alcoholes alifáticos).

Los pro-fármacos de ejemplo son, por ejemplo, los ésteres de ácidos carboxílicos libres, los derivados S-acílicos de tioles y los derivados O-acílicos de alcoholes o fenoles, en donde el acilo tiene un significado como se define en la presente. Se prefieren los derivados de éster farmacéuticamente aceptables que se puedan convertir mediante solvólisis bajo condiciones fisiológicas hasta el ácido carboxílico progenitor, por ejemplo, ésteres de alquilo inferior, ésteres de cicloalquilo, ésteres de alquenilo inferior, ésteres de bencilo, ésteres de alquilo inferior mono- o di-sustituídos, tales como los ésteres de ω -(amino, mono- o di-alquilo inferior-amino, carboxi, alcoxilo inferior-carbonil)-alquilo inferior, los ésteres de α -(alcanoiloxilo inferior, alcoxilo inferior-carbonil, o di-alquilo inferior-amino-carbonil)-alquilo inferior, tales como el éster de pivaloiloxi-metilo y similares, convencional-mente utilizados en este campo. En adición, las aminas se han enmascarado como derivados sustituidos por aril-carboniloxi-metilo que son disociados por las esterasas *in vivo*, liberando el fármaco libre y formaldehído (Bundgaard, *J. Med. Chem.* 2503 (1989)). Más

aún, los fármacos que contienen un grupo NH ácido, tal como imidazol, imida, indol, y similares, se han enmascarado con grupos N-aciloxi-metilo (Bundgaard, *Design of Prodrugs*, Elsevier (1985)). Los grupos hidroxilo se han enmascarado como ésteres y éteres. La Patente Europea Número EP 039,051 (Sloan y Little) da a conocer pro-fármacos de ácido hidroxámico de base de Mannich, su preparación y uso.

- 5 Adicionalmente, los compuestos de la presente divulgación, incluyendo sus sales, también se pueden obtener en la forma de sus hidratos, o pueden incluir otros solventes utilizados para su cristalización.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la presente invención, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede formular para vías de administración particulares, tales como administración oral, administración oftálmica (por ejemplo, la administración tópica, inyección intravítrea, implante (incluyendo intravítreo, trans-esclerótico, sub-tenon, y similares, depósito o similares), y administración parenteral, etc. En adición, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden configurar en una forma sólida, incluyendo cápsulas, tabletas, píldoras, gránulos, polvos o supositorios, o en una forma líquida, incluyendo soluciones, suspensiones o emulsiones. Las composiciones farmacéuticas se pueden someter a las operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización, y/o pueden contener diluyentes inertes, agentes lubricantes, o agentes reguladores convencionales, así como adyuvantes, tales como conservadores, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes y reguladores del pH, etc.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas son tabletas y cápsulas de gelatina que comprenden el ingrediente activo junto con:

- 20 a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina;
b) lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o de calcio y/o polietilenglicol; para tabletas también,
c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metil-celulosa, carboxi-metil-celulosa de sodio y/o polivinil-pirrolidona; si se desea,
25 d) desintegrantes, por ejemplo, almidones, agar, ácido alginico o su sal sódica, o mezclas efervescentes; y/o
e) absorbentes, colorantes, saborizantes y edulcorantes.

Las tabletas pueden tener recubrimiento de película o recubrimiento entérico de acuerdo con los métodos conocidos en este campo.

Las composiciones adecuadas para su administración oral incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención en la forma de tabletas, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones pretendidas para uso oral se preparan de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la elaboración de composiciones farmacéuticas, y estas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados a partir del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, y agentes conservadores, con el objeto de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y de buen sabor. Las tabletas contienen al ingrediente activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que sean adecuados para la elaboración de tabletas. Estos excipientes son, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio, o fosfato de sodio; agentes de granulación o desintegrantes, por ejemplo almidón de maíz, o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina, o acacia; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco. Las tabletas no se recubren, o bien se recubren mediante técnicas conocidas para demorar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y de esta manera proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de demora de tiempo tal como monestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para uso oral se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en donde se mezcla el ingrediente activo con un diluyente sólido inerte, por ejemplo carbonato de calcio, fosfato de calcio, o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde se mezcla el ingrediente activo con agua o con un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.

Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan convenientemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Estas composiciones se pueden esterilizar y/o pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservadores, estabilizantes, humectantes, o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica, y/o reguladores del pH. En adición, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Estas composiciones se preparan de acuerdo con los métodos convencionales de mezcla, granulación, o recubrimiento, respectivamente, y contienen de aproximadamente el 0.1 al 75 %, o contienen de aproximadamente el 1 al 50 % del ingrediente activo.

55 Ciertas composiciones inyectables incluyen implantes oculares y formulaciones de depósito ocular que son adecuadas para su administración intraocular, periocular, subconjuntival y/o sub-tenon. Típicamente, las

composiciones inyectables comprenden un compuesto de la invención en combinación con un material polimérico biocompatible o biodegradable.

Las composiciones adecuadas para su aplicación transdérmica incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de la invención con un vehículo. Los vehículos incluyen solventes farmacológicamente aceptables absorbibles para ayudar al paso a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en la forma de un parche que comprende un miembro de respaldo, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera de control de velocidad para suministrar el compuesto de la piel del huésped a una velocidad controlada y previamente determinada durante un período de tiempo prolongado, y elementos para asegurar el dispositivo a la piel. Las composiciones adecuadas para su aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y a los ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles o formulaciones rociables, por ejemplo, para su suministro mediante aerosol o similares. Estos sistemas de suministro tópico serán particularmente apropiados para la aplicación ocular, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedad ocular, por ejemplo, para uso profiláctico o terapéutico en el tratamiento de degeneración macular, retinopatía diabética, rubeosis iridis, neovascularización de la córnea, esclerótica, retina, u otro tejido ocular, y similares. Por consiguiente, son adecuados en particular para utilizarse en formulaciones tópicas bien conocidas en este campo. Éstas pueden contener solubilizantes, estabilizantes, agentes mejoradores de la tonicidad, reguladores, y conservadores.

Ciertas formulaciones tópicas de gotas para los ojos adecuadas comprenden una solución acuosa o una suspensión acuosa de un compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones, que comprende además opcionalmente uno o más conservadores, agentes de tonicidad, y/o lubricantes. Como se utiliza en la presente, una aplicación tópica también puede pertenecer a una inhalación o a una aplicación intranasal. De una manera conveniente se suministra en la forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo, una mezcla seca con lactosa, o bien como una partícula componente mezclada, por ejemplo, con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o de una presentación de aspersión en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, aspersor, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado.

Las composiciones oftálmicas de la presente invención se formulan para ser compatibles con el ojo y/u otros tejidos que se vayan a tratar con las composiciones. Para la aplicación tópica al ojo, las composiciones de la presente invención se formularán en términos generales como composiciones acuosas estériles (por ejemplo, suspensiones, soluciones, emulsiones o similares), y típicamente incluyen al menos el 70 % en peso/ volumen, más típicamente el 80 % en peso/volumen, y todavía más típicamente al menos el 90 o el 95 % en peso/volumen de agua purificada. Las composiciones pueden incluir cualquier combinación de los siguientes ingredientes: uno o más conservadores (por ejemplo, un compuesto de amonio cuaternario polimérico), uno o más tensoactivos (por ejemplo, polisorbato, tiloxapol, aceite de ricino polietoxilado, combinaciones de los mismos, o similares), uno o más agentes de viscosidad (por ejemplo, celulosa sustituida, polímero de galactomanano, polímero de carboxivinilo, combinaciones de los mismos, o similares), uno o más reguladores (por ejemplo, borato), uno o más agentes de tonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio), uno o más polioles (por ejemplo, propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol, combinaciones de los mismos, o similares) u otros ingredientes adecuados. Las composiciones oftálmicas pretendidas para su aplicación directa a la superficie de la córnea del ojo se formularán para tener un pH y una tonicidad que sean compatibles con el ojo. Las composiciones típicamente tendrán un pH en el intervalo de 4 a 9, de preferencia de 5.5 a 8.5, y de una manera muy preferible de 5.5 a 8.0. Los intervalos de pH particularmente deseados son de 6.0 a 7.8, y más específicamente de 6.4 a 7.6. Las composiciones tendrán una osmolalidad de 200 a 400 o 450 miliosmoles por kilogramo (mOsm/kilogramo), más preferiblemente de 240 a 360 mOsm/ kilogramo. Además, las composiciones oftálmicas adecuadas para la aplicación tópica de múltiples dosis con frecuencia se disponen en un gotero para los ojos, el cual puede dosificar gotas individuales a la superficie de la córnea del ojo.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras, las cuales comprenden los compuestos de la presente invención como ingredientes activos, debido a que el agua puede facilitar la degradación de ciertos compuestos.

Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación anhidras de la invención se pueden preparar utilizando ingredientes anhidros o que contengan una baja humedad, y condiciones de baja humedad. Una composición farmacéutica anhidra puede ser preparada y almacenada de tal manera que se mantenga su naturaleza anhidra. De conformidad con lo anterior, las composiciones anhidras de preferencia se empaquetan utilizando materiales que se sepa que previenen la exposición al agua, de tal forma que se puedan incluir en kits de formulación adecuados. Los ejemplos del empaque adecuado incluyen, pero no se limitan a, láminas herméticamente selladas, plásticos, recipientes de dosis unitaria (por ejemplo, frascos), paquetes de burbuja, y paquetes de tiras.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad a la cual se descompondrá el compuesto de la presente invención como un ingrediente activo. Estos agentes, los cuales son referidos en la presente como "estabilizantes", incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, tales como ácido ascórbico, reguladores del pH, o reguladores de sales, etc.

Los compuestos de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, exhiben valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, propiedades moduladoras de los receptores de del factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF), por ejemplo, como se indica en las pruebas *in vitro* e *in vivo*, como se proporcionan en las siguientes secciones y, por consiguiente, se indican para uso en terapia.

Basándose en la propiedad de los compuestos como potentes inhibidores de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el compuesto de la invención es en especial adecuado para el tratamiento de las enfermedades asociadas con una angiogénesis mal regulada, en especial las enfermedades causadas por neovascularización ocular, en especial retinopatías tal como retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con el envejecimiento, rubeosis iridis, soriasis, enfermedad de Von Hippel Lindau, hemangioblastoma, angioma, trastornos proliferativos de las células mesangiales, tales como enfermedades renales crónicas o agudas, por ejemplo, nefropatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica o rechazo de trasplante, o en especial enfermedad renal inflamatoria, tal como glomerulonefritis, en especial glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome hemolítico-urémico, nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, ateroma,estenosis arterial, enfermedades autoinmunes, inflamación aguda, trastornos fibróticos (por ejemplo, cirrosis hepática), diabetes, endometriosis, asma crónico, ateroesclerosis arterial o posterior a trasplante, trastornos neurodegenerativos, y en especial las enfermedades neoplásicas (en especial tumores sólidos pero también leucemias), tales como en especial cáncer de mama, adenocarcinoma, cáncer colo-rectal, cáncer de pulmón (en especial cáncer pulmonar no microcelular), cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de ovario o cáncer de la próstata, así como mieloma, en especial mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloblástica aguda (AML) (leucemia mieloide aguda), AMM (metaplasia mieloide agnógena), mesotelioma, glioma y glioblastoma. Un compuesto de la invención es en especial adecuado también para prevenir la extensión metastásica de tumores y el crecimiento de micrometástasis.

Por consiguiente, como una realización adicional, la presente invención proporciona el compuesto de la invención para uso en terapia. En una realización adicional, la terapia se selecciona a partir de una enfermedad que sea mitigada mediante la inhibición de la actividad del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En otra realización, la enfermedad se selecciona a partir de la lista anteriormente mencionada, de una manera adecuada enfermedades oculares, de una manera más adecuada degeneración macular húmeda y seca relacionada con el envejecimiento, atrofia geográfica, retinopatía serosa central, edema macular quistoide, retinopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa, edema macular diabético, rubeosis iridis, retinopatía de prematuridad, oclusiones de venas retinales centrales y ramificadas, neovascularización/edema retinal inflamatorio/infeccioso (por ejemplo, uveítis posterior, sarcoide, toxoplasmosis, histoplasmosis, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada, uveítis crónica, tuberculosis, sífilis, corioidopatía interna punteada y multifocal), retinoblastoma, melanoma, tumores oculares, desprendimiento retinal, neovascularización miópica, rayas angioideas, enfermedad de Eales, retinopatía isquémica (oclusión de arterias retinales, artritis de Takayasu, oclusión de arteria carótida), ruptura coroidal, uso de lentes de contacto, ojo seco, blefaritis, distrofias de la córnea, trauma y cirugía previa a la córnea (injertos de córnea, LASIK, LASEK), infecciones de córnea (bacterianas, virales, parasitarias, herpéticas), quemaduras de córnea (por productos químicos, alcalinos, ácidos), rechazo de injerto de córnea, enfermedad inmunológica de la córnea (penfigoide, síndrome de Stevens-Johnson), y enfermedades degenerativas de la córnea.

La composición farmacéutica (o, para propósitos de referencia, combinación) de la presente invención puede estar en una dosificación unitaria de aproximadamente 1 a 1,000 miligramos de ingrediente(s) activo(s) para un sujeto de aproximadamente 50 a 70 kilogramos, o de aproximadamente 1 a 500 miligramos, o de aproximadamente 1 a 250 miligramos, o de aproximadamente 1 a 150 miligramos, o de aproximadamente 0.5 a 100 miligramos, o de aproximadamente 1 a 50 miligramos de ingredientes activos. La dosificación terapéuticamente efectiva de un compuesto, de la composición farmacéutica, o de las combinaciones de los mismos, depende de la especie del sujeto, del peso corporal, de la edad y condición individual, del trastorno o enfermedad que se esté tratando, o de la gravedad de la misma. Un médico, clínico, o veterinario de una experiencia ordinaria puede determinar fácilmente la cantidad efectiva de cada uno de los ingredientes activos necesaria para prevenir, tratar, o inhibir el progreso del trastorno o de la enfermedad.

Las propiedades de dosificación anteriormente citadas se pueden demostrar en pruebas *in vitro* e *in vivo* utilizando convenientemente mamíferos, por ejemplo, ratones, ratas, perros, monos u órganos aislados, tejidos y preparaciones de los mismos. Los compuestos de la presente invención se pueden aplicar *in vitro* en la forma de soluciones, por ejemplo, de preferencia soluciones acuosas, e *in vivo* ya sea enteralmente, parenteralmente, de una manera conveniente intravenosamente, por ejemplo, como una suspensión o en solución acuosa. La dosificación *in vitro* puede estar en el intervalo de concentraciones de entre aproximadamente 10^{-3} molar y 10^{-9} molar. Una cantidad terapéuticamente efectiva *in vivo*, dependiendo de la vía de administración, puede estar en el intervalo de entre aproximadamente 0.1 y 500 miligramos/kilogramo, o de entre aproximadamente 1 y 100 miligramos/kilogramo.

En otras realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica, la cual comprende al menos un compuesto de acuerdo con la primera a la septuagésima realizaciones y al menos un vehículo.

El compuesto también se puede utilizar con ventaja en combinación con otros agentes anti-proliferativos. Estos agentes anti-proliferativos incluyen, pero no se limitan a, los inhibidores de aromatasas; anti-estrógenos; inhibidores de topoisomerasa I; inhibidores de topoisomerasa II; agentes activos en microtúbulos; agentes alquilantes; inhibidores de desacetilasa de histona; compuestos que inducen los procesos de diferenciación celular; inhibidores de ciclo-oxigenasa; inhibidores de MMP; inhibidores de mTOR; anti-metabolitos anti-neoplásicos; compuestos de

platina; compuestos que dirigen/reducen una actividad de proteína quinasa o de lípido y otros compuestos anti-angiogénicos; compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de una fosfatasa de proteína o de lípido; agonistas de gonadorelina; anti-andrógenos; inhibidores de amino-peptidasa de metionina; bisfosfonatos; modificadores de la respuesta biológica; anticuerpos anti-proliferativos; inhibidores de heparanasa; inhibidores de las isoformas oncogénicas Ras; inhibidores de telomerasa; inhibidores de proteasoma; agentes utilizados en el tratamiento de malignidades hematológicas; compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de Flt-3; inhibidores de HSP90; temozolomida (TEMODAL®); y leucovorina.

El compuesto también se puede utilizar con ventaja en combinación con otros productos terapéuticos oftálmicos, incluyendo, pero no limitándose a, Macugen, trampa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), terapia fotodinámica, acetato de anecortave, esteroides, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (por ejemplo, naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco), inhibidores de Cox-1 y Cox-2, ciclosporina, dexametasona, inhibidores de mTOR (objetivo de rapamicina de mamífero), tales como rapamicina, everolimus, y similares, inhibidores de PKC (quinasa C de proteína) beta, inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa, inhibidores de interleucina-1-beta, inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta y alfa y de sus receptores, Lucentis®, Avastin, Eylea, anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), anticuerpos contra PLGF, siARN contra la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (A-E, PLGF, neurofilina) / receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidores de complemento de dirección de las sendas clásicas, alternativas, y de lectina, inhibidores de IL-10, inhibidores de C5aR, inhibidores de C3aR, e inhibidores de fosfato de esfingosina y receptores.

El compuesto de la presente invención se puede administrar ya sea simultáneamente con, o antes o después de, al menos otro agente terapéutico. El compuesto de la presente invención se puede administrar por separado, por la misma o diferente vía de administración, o junto en la misma composición farmacéutica.

En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona a partir de:

El término "inhibidor de aromatasa", como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto que inhibe la producción de estrógeno, es decir, la conversión de los sustratos androstenediona y testosterona hasta estrona y estradiol, respectivamente. El término incluye, pero no se limita a, esteroides, en especial atamestano, exemestano y formestano y, en particular, no esteroides, en especial amino-glutetimida, rogletimida, pirido-glutetimida, trilostano, testolactona, quetoconazol, vorozol, fadrozol, anastrozol y letrozol. El exemestano se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada AROMASIN. El formestano se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada LENTARON. El fadrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada AFEMA. El anastrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada ARIMIDEX. El letrozol se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada FEMARA o FEMAR. La amino-glutetimida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada ORIMETEN. Una combinación de la invención que comprenda un agente quimioterapéutico que sea un inhibidor de aromatasa, es en particular útil para el tratamiento de los tumores positivos para el receptor de hormonas, por ejemplo, tumores de mama.

El término "anti-estrógeno", como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto que antagoniza el efecto de los estrógenos al nivel del receptor de estrógeno. El término incluye, pero no se limita a, tamoxifeno, fulvestrant, raloxifeno y clorhidrato de raloxifeno. El tamoxifeno se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada NOLVADEX. El clorhidrato de raloxifeno se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada EVISTA. El fulvestrant se puede formular como se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,659,516 o se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada FASLODEX. Una combinación de la invención que comprenda un agente quimioterapéutico que sea un anti-estrógeno es en particular útil para el tratamiento de los tumores positivos para el receptor de estrógeno, por ejemplo, tumores de mama.

El término "anti-andrógeno", como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de inhibir los efectos biológicos de las hormonas androgénicas e incluye, pero no se limita a, bicalutamida (CASODEX), que se puede formular, por ejemplo, como se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,636,505.

El término "agonista de gonadorelina", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, abarelix, goserelina y acetato de goserelina. La goserelina se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,100,274 y se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada ZOLADEX. El abarelix se puede formular, por ejemplo, como se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,843,901.

El término "inhibidor de topoisomerasa I", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, topotecano, gimatecano, irinotecano, camptotecina y sus análogos, 9-nitro-camptotecina y el conjugado de camptotecina

macromolecular PNU-166148 (el compuesto A1 de la Publicación Internacional Número WO99/ 17804). El irinotecano se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada CAMPTOSAR. El topotecano se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada HYCAMTIN.

- 5 El término "inhibidor de topoisomerasa II", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, las antraciclinas, tales como doxorubicina (incluyendo la formulación liposomal, por ejemplo, CAELYX), daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina y nemorrubicina, las antraquinonas mitoxantrona y losoxantrona, y las podofilotoxinas etoposida y teniposida. La etoposida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada ETOPOPHOS. La teniposida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada VM 26-BRISTOL. La doxorubicina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada ADRIBLASTIN o ADRIAMYCIN. La epirubicina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada FARMORUBICIN. La idarrubicina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada ZAVEDOS. La mitoxantrona se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo, bajo la marca comercial registrada NOVANTRON.

- 20 El término "agente activo en microtúbulos" se refiere a los agentes estabilizantes de microtúbulos, desestabilizantes de microtúbulos, y a los inhibidores de la polimerización de microtubulina, incluyendo, pero no limitándose a, taxanos, por ejemplo paclitaxel y docetaxel, alcaloides vinca, por ejemplo vinblastina, en especial sulfato de vinblastina, vincristina, en especial sulfato de vincristina, y vinorelbina, discodermolidas, colquicina, y epotilonas y sus derivados, por ejemplo epotilona B o D o sus derivados. El paclitaxel se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo TAXOL. El docetaxel se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada TAXOTERE. El sulfato de vinblastina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada VINBLASTIN R. P. El sulfato de vincristina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada FARMISTIN. La discodermolida se puede obtener, por ejemplo, como se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,010,099. También se incluyen los derivados de epotilona que se dan a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO 98/10121, US 6,194,181, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 y WO 00/31247. Se prefieren en especial Epotilona A y/o B.

- El término "agente alquilante", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano, o nitrosourea (BCNU o Gliadel). La ciclofosfamida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada CYCLOSTIN. La ifosfamida se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada HOLOXAN.

- 35 El término "inhibidores de desacetilasa de histona" o "inhibidores de HDAC", se refiere a los compuestos que inhiben la desacetilasa de histona, y que poseen una actividad anti-proliferativa. Esto incluye los compuestos que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 02/22577, en especial N-hidroxi-3-[4-[(2-hidroxi-etil)-[2-(1H-indol-3-il)-etil]-amino]-metil]-fenil]-2E-2-propenamida, N-hidroxi-3-[4-[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]-metil]-fenil]-2E-2-propenamida, y las sales farmacéutica-mente aceptables de las mismas. Además incluye en especial el ácido hidroxámico de suberoil-anilida (SAHA).

- 40 El término "anti-metabolito anti-neoplásico", incluye, pero no se limita a, 5-fluoro-uracilo (5-FU); capecitabina; gemcitabina; agentes desmetilantes del ADN, tales como 5-aza-citidina y decitabina; metotrexato; edatrexato; y antagonistas de ácido fólico tales como pemetrexed. La capecitabina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada XELODA. La gemcitabina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada GEMZAR. También se incluyen el anticuerpo monoclonal trastuzumab, el cual se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada HERCEPTIN.

- 50 El término "compuesto de platina", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, carboplatina, cisplatina, cisplatino, y oxaliplatina. La carboplatina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada CARBOPLAT. La oxaliplatina se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada ELOXATIN.

El término "compuestos que dirigen/reducen una actividad de proteína quinasa o lípido y otros compuestos anti-angiogénicos", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a: inhibidores de proteína quinasa tirosina y/o de quinasa de serina y/o treonina, o inhibidores de quinasa de lípido, por ejemplo:

- 55 a) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-Rs);
b) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad del receptor del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-IR), en especial los compuestos que inhiben el IGF-IR, tales como los compuestos que se dan a conocer en la

Publicación Internacional Número WO 02/092599;

- c) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la familia de quinasa de tirosina receptor Trk;
- d) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la familia de quinasa de tirosina receptora Axl;
- e) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad del receptor c-Met;

5 f) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de los miembros de la quinasa C de proteína (PKC) y de la familia de quinasas de serina/treonina Raf, los miembros de la familia MEK, SRC, JAK, FAK, PDK, y Ras/MAPK, o la familia de quinasa-PI(3), o de la familia de quinasa relacionada con quinasa-PI(3), y/o los miembros de la familia de quinasa dependiente de ciclina (CDK), y son en especial los derivados de estaurosporina que se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,093,330, por ejemplo midostaurina; los ejemplos
10 de otros compuestos incluyen, por ejemplo, UCN-01, safinol, BAY 43-9006, Briostatina 1, perifosina; ilmofofina; RO 318220 y RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531/LY379196; compuestos de isoquinolina tales como aquéllos que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO00/09495; FTIs; PD184352 o QAN697 (un inhibidor de PI3K);

15 g) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de una proteína quinasa tirosina, tales como mesilato de imatinib (GLIVEC/GLEEVEC), o tirfostina. Una tirfostina de preferencia es un compuesto de bajo peso molecular (Mr < 1500), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en especial un compuesto seleccionado a partir de la clase de benciliden-malonitrilo de la clase de compuestos de S-aril-bencen-malonitrilo o del bisustrato de quinolina, más especialmente cualquier compuesto seleccionado a partir del grupo que consiste en: Tirfostina A23/RG-50810; AG 99; Tirfostina AG 213; Tirfostina AG 1748; Tirfostina AG 490; Tirfostina B44; enantiómero de Tirfostina B44 (+);
20 Tirfostina AG 555; AG 494; Tirfostina AG 556, AG957 y adafostina (adamantil-éster del ácido 4-[(2,5-dihidroxifenil)-metil]-amino}benzoico; NSC680410, adafostina); y

h) compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la familia de quinasas de tirosina receptoras del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo- o hetero-dímeros), tales como los
25 compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, que son en especial los compuestos, proteínas, o anticuerpos que inhiben a los miembros de la familia de quinasa de tirosina receptora del factor de crecimiento epidérmico, por ejemplo los receptores de EGF, ErbB2, ErbB3, y ErbB4, o que se enlazan con el EGF o con los ligandos relacionados con EGF, y son en particular los compuestos, proteínas, o anticuerpos monoclonales genérica y específicamente dados a conocer en la Publicación Internacional Número WO 97/02266, por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 39, o en las Patentes Números EP 0
30 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 y en especial WO 96/30347 (por ejemplo, el compuesto conocido como CP 358774), WO 96/33980 (por ejemplo, el compuesto ZD 1839), y WO 95/03283 (por ejemplo, el compuesto ZM105180); por ejemplo trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab, Iressa, erlotinib (Tarceva^{MR}), CI-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 o E7.6.3, y los derivados de 7H-pirrolo-[2,3-d]-pirimidina, que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 03/013541.

Otros compuestos anti-angiogénicos incluyen compuestos que tengan otro mecanismo para su actividad, por ejemplo no relacionados con la inhibición de proteína quinasa o de lípido, por ejemplo talidomida (THALOMID), y TNP-470.

40 Los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de una fosfatasa de proteína o de lípido, son, por ejemplo, los inhibidores de fosfatasa 1, fosfatasa 2A, PTEN, o CDC25, por ejemplo ácido ocaidaico o un derivado del mismo.

Los compuestos que inducen los procesos de diferenciación celular son, por ejemplo, ácido retinoico, α -, γ -, o β -tocoferol, o α -, γ - o β -tocotrienol.

45 El término "inhibidor de ciclo-oxigenasa", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, por ejemplo, inhibidores de Cox-2, ácido 2-aril-amino-fenil-acético sustituido por 5-alquilo y sus derivados, tales como celecoxib (CELEBREX), rofecoxib (VIOXX), etoricoxib, valdecoxib, o un ácido 5-alquil-2-aril-amino-fenil-acético, por ejemplo ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoro-anilino)-fenil-acético, lumiracoxib.

El término "inhibidores de mTOR", se refiere a los compuestos que inhiben el objetivo de mamífero de la rapamicina (mTOR), y que poseen una actividad anti-proliferativa, tales como sirolimus (Rapamune®), everolimus (Certican^{MR}),
50 CCI-779, y ABT578.

El término "bisfosfonatos", como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, ácido etridónico, clodronico, tiludronico, pamidronico, alendronico, ibandronico, risedronico, y zoledronico. El ácido "etridónico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada DIDRONEL. El "ácido clodronico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada BOFENOS. El "ácido tiludronico" se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada SKELID. El "ácido pamidronico" se puede administrar, por
55

ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada AREDIA^{MR}. El “ácido alendrónico” se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada FOSAMAX. El “ácido ibandrónico” se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada BONDRANAT. El “ácido risedrónico” se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada ACTONEL. El “ácido zoledrónico” se puede administrar, por ejemplo, en la forma como se comercia, por ejemplo bajo la marca comercial registrada ZOMETA.

El término “inhibidor de heparanasa”, como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la degradación del sulfato de heparina. El término incluye, pero no se limita a, PI-88.

El término “modificador de la respuesta biológica”, como se utiliza en la presente, se refiere a una linfocina o a interferones, por ejemplo interferón-γ.

El término “inhibidor de las isoformas oncogénicas Ras”, por ejemplo H-Ras, K-Ras, o N-Ras, como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad oncogénica de Ras, por ejemplo un “inhibidor de farnesil-transferasa”, por ejemplo L-744832, DK8G557 o R115777 (Zarnestra).

El término “inhibidor de telomerasa”, como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la telomerasa. Los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la telomerasa son en especial los compuestos que inhiben al receptor de telomerasa, por ejemplo telomestatina.

El término “inhibidor de amino-peptidasa de metionina”, como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la amino-peptidasa de metionina. Los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de la amino-peptidasa de metionina son, por ejemplo, bengamida o un derivado de la misma.

El término “inhibidor de proteasoma”, como se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad del proteasoma. Los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad del proteasoma incluyen, por ejemplo, PS-341 y MLN 341.

El término “inhibidor de metaloproteínasa de matriz” o (“inhibidor de MMP”), como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, los inhibidores peptidomiméticos y no peptidomiméticos de colágeno, derivados de tetraciclina, por ejemplo el inhibidor peptidomimético de hidroxamato, batimastato, y su análogo oralmente biodisponible marimastato (BB-2516), prinomastato (AG3340), metastato (NSC 683551) BMS-279251, BAY 12-9566, TAA211, MMI270B o AAJ996.

El término “agentes utilizados en el tratamiento de malignidades hematológicas”, como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, inhibidores de quinasa de tirosina tipo FMS, por ejemplo los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de Flt-3; interferón, 1-b-D-arabino-furanosil-citosina (ara-c), y bisulfano; y los inhibidores de ALK, por ejemplo los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la quinasa de linfoma anaplásico.

El término “compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad Flt-3”, son en especial los compuestos, proteínas, o anticuerpos que inhiben Flt-3, por ejemplo PKC412, midostaurina, un derivado de estaurosporina, SU11248 y MLN518.

El término “inhibidores de HSP90”, como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad intrínseca de ATPasa de HSP90; que degradan, dirigen, reducen, o inhiben las proteínas cliente de HSP90 por medio de la senda del proteasoma de ubiquitina. Los compuestos que dirigen, reducen, o inhiben la actividad de ATPasa intrínseca de HSP90 son en especial los compuestos, proteínas, o anticuerpos que inhiben la actividad de ATPasa de HSP90, por ejemplo, 17-alil-amino, 17-desmetoxi-geldanamicina (17AAG), un derivado de geldanamicina; otros compuestos relacionados con geldanamicina; radicicol, e inhibidores de HDAC.

El término “anticuerpos anti-proliferativos”, como se utiliza en la presente, incluye, pero no se limita a, trastuzumab (Herceptin®), Trastuzumab-DM1, ranibizumab (Lucentis®), bevacizumab (Avastin^{MR}), rituximab (Rituxan®), PRO64553 (anti-CD40), y anticuerpo 2C4, y Eylea®. Anticuerpo significa, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados de cuando menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

Para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML), los compuestos de la primera a la septuagésima realizaciones se pueden utilizar en combinación con las terapias para leucemia convencionales, en especial en combinación con las terapias utilizadas para el tratamiento de leucemia mieloblástica aguda (AML). En particular, los compuestos de la primera a la septuagésima realizaciones se pueden administrar en combinación con, por ejemplo, los inhibidores de farnesil-transferasa y/u otros fármacos útiles para el tratamiento de leucemia mieloblástica aguda (AML), tales como Daunorubicina, Adriamicina, Ara-C, VP-16, Teniposida, Mitoxantrona, Idarrubicina, Carboplatino, y PKC412.

La estructura de los agentes activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales, se puede tomar de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de las bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications). Los compuestos anteriormente mencionados, los cuales se pueden utilizar en combinación con un compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones, se pueden preparar y administrar como se describe en este campo, tal como en los documentos citados anteriormente.

El compuesto de la invención también se puede utilizar con ventaja en combinación con los procesos terapéuticos conocidos, por ejemplo, la administración de hormonas o en especial radiación.

El compuesto de la invención se puede utilizar en particular como un radiosensibilizante, en especial para el tratamiento de tumores que exhiban una pobre sensibilidad a la radioterapia.

En una realización, la invención proporciona un producto que comprende el compuesto de la invención y al menos otro agente terapéutico, como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado, o en secuencia, en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende el compuesto de la invención y los otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o el compuesto de la invención y los otros agentes terapéuticos en una forma separada, por ejemplo, en la forma de un kit.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica, la cual comprende el compuesto de la invención y otros agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe anteriormente.

En una realización, la invención proporciona un kit, el cual comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene el compuesto de la invención. En una realización, el kit comprende elementos para contener por separado estas composiciones, tales como un recipiente, un frasco dividido, o un paquete de lámina dividido. Un ejemplo de este kit es un paquete de burbujas, como se utiliza típicamente para el empaque de tabletas, cápsulas y similares.

El kit de la invención se puede utilizar para administrar formas de dosificación diferentes, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas en diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas una contra la otra. Para ayudar al cumplimiento, el kit de la invención típicamente comprende instrucciones para la administración. En las terapias de combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico pueden ser elaborados y/o formulados por el mismo o por diferentes fabricantes. Más aún, el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico, se pueden reunir en una terapia de combinación: (i) antes de liberar el producto de combinación a los médicos (por ejemplo, en el caso de un kit que comprenda el compuesto de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la guía del médico) poco antes de la administración; (iii) en los pacientes mismos, por ejemplo, durante la administración en secuencia del compuesto de la invención y el otro agente terapéutico.

De conformidad con lo anterior, la invención proporciona el uso del compuesto de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el medicamento se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el medicamento se prepara para su administración con un compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones.

La invención también proporciona el compuesto de la invención para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el compuesto de la invención se prepara para su administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el otro agente terapéutico se prepara para su administración con el compuesto de la invención. La invención también proporciona el compuesto de la invención para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el otro agente terapéutico se administra con un compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones.

La invención también proporciona el uso del compuesto de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o por un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o por el receptor del mismo, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con un compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitaciones sobre la misma. Las temperaturas se dan en centígrados. Si no se menciona de otra manera, todas las evaporaciones se llevan a cabo bajo presión reducida, de preferencia entre aproximadamente 15 mm Hg y 100 mm Hg (= de 20 a 133 mbar). La estructura de los productos finales, los intermediarios y los materiales de partida se confirma mediante métodos analíticos convencionales, por ejemplo, microanálisis y características espectroscópicas, por ejemplo, MS, IR, RMN. Las abreviaturas empleadas son aquéllas convencionales en la materia.

Todos los materiales de partida, bloques de construcción, reactivos, ácidos, bases, agentes deshidratantes, solventes, y catalizadores utilizados para la síntesis de los compuestos de la presente invención, son cualquiera de los que se encuentran comercialmente disponibles, o se pueden producir mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por una persona con experiencia normal en la técnica (Houben-Weyl, 4ª Edición, 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volumen 21). Además, los compuestos de la presente invención se pueden producir mediante los métodos de síntesis orgánica conocidos por una persona con experiencia normal en la técnica, como se muestra en los siguientes ejemplos.

Basándose en la propiedad de los compuestos de la invención como potentes inhibidores de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los compuestos en especial adecuados para el tratamiento de las enfermedades asociadas con una angiogénesis mal regulada, en especial de las enfermedades causadas por neovascularización ocular, en especial retinopatías tales como retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con el envejecimiento, soriasis, enfermedad de Von Hippel Lindau, hemangioblastoma, angioma, trastornos proliferativos de las células mesangiales, tales como enfermedades renales crónicas o agudas, por ejemplo, nefropatía diabética, nefroesclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica o rechazo de trasplante, o en especial enfermedad renal inflamatoria, tal como glomerulonefritis, en especial glomerulonefritis mesangio-proliferativa, síndrome hemolítico-urémico, nefropatía diabética, nefroesclerosis hipertensiva, ateroma, restenosis arterial, enfermedades autoinmunes, inflamación aguda, incluyendo artritis reumatoide, trastornos fibróticos (por ejemplo, cirrosis hepática), diabetes, endometriosis, asma crónico, aterosclerosis arterial o posterior a trasplante, trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, esclerosis múltiple, y en especial las enfermedades neoplásicas tales como cáncer (en especial tumores sólidos pero también leucemias), tal como en especial cáncer de mama, adenocarcinoma, cáncer colo-rectal, cáncer de pulmón (en especial cáncer pulmonar no microcelular), cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de ovario o cáncer de la próstata así como mieloma, en especial mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloblástica aguda (AML) (leucemia mieloide aguda), AMM (metaplasia mieloide agnógena), mesotelioma, glioma y glioblastoma. Un compuesto de la primera a la septuagésima realizaciones es en especial adecuado también para prevenir la extensión metastásica de los tumores y el crecimiento de micrometástasis. Los compuestos de la primera a la septuagésima realizaciones, debido a su actividad como quinasas, también son útiles en el tratamiento en relación con trasplantes.

Compuestos Cristalinos

Como se utiliza en la presente, "polimorfo" se refiere a las formas cristalinas que tienen la misma composición química pero diferentes arreglos espaciales de las moléculas, átomos, y/o iones que formen el cristal.

Como se utiliza en la presente, "solvato" se refiere a una forma cristalina de una molécula, átomo, y/o iones, que comprende además moléculas de un solvente o solventes incorporados en la estructura de la celosía cristalina. Las moléculas de solvente en el solvato pueden estar presentes en un arreglo regular y/o en un arreglo no ordenado. El solvato puede comprender una cantidad ya sea estequiométrica o no estequiométrica de las moléculas de solvente. Por ejemplo, un solvato con una cantidad no estequiométrica de las moléculas de solvente puede resultar de la pérdida parcial del solvente a partir del solvato. Los solvatos se pueden presentar como dímeros u oligómeros, los cuales comprenden más de una molécula de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida dentro de la estructura de la celosía cristalina.

Como se utiliza en la presente, "amorfa" se refiere a una forma sólida de una molécula, átomo, y/o iones, que no es cristalina. Un sólido amorfo no exhibe un patrón de difracción de rayos-X definitivo.

Como se utiliza en la presente, "sustancialmente pura", cuando se utiliza con referencia a una forma, significa un compuesto que tiene una pureza mayor del 90 % en peso, incluyendo mayor del 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, y 99 % en peso, y también incluyendo igual a aproximadamente el 100 % en peso de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, basándose en el peso del compuesto. El material restante comprende otras formas del compuesto, y/o impurezas de la reacción, y/o

impurezas del procesamiento que se presenten a partir de su preparación. Por ejemplo, una forma cristalina de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida se puede considerar como sustancialmente pura cuando tenga una pureza mayor del 90 % en peso, como se mida por medios que sean conocidos en este tiempo y que sean generalmente aceptados en la materia, en donde menos del 10 % en peso restante del material comprende otras formas de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida y/o impurezas de la reacción y/o impurezas del procesamiento.

Otra manera de definir "sustancialmente pura" es como sigue:

Como se utiliza en la presente, el término "sustancialmente pura" con referencia a una forma polimórfica particular significa que la forma polimórfica incluye menos del 10 %, de preferencia menos del 5 %, más preferiblemente menos de 3 %, más preferiblemente menos del 1 % en peso de cualesquiera otras formas físicas del compuesto.

En una realización de la divulgación, se proporciona una forma cristalina de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida en una forma sustancialmente pura. Esta forma cristalina de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida en una forma sustancialmente pura se puede emplear en las composiciones farmacéuticas, las cuales pueden incluir opcionalmente uno o más componentes diferentes seleccionados, por ejemplo, a partir del grupo que consiste en excipientes, vehículos, y una de otras entidades químicas de ingredientes farmacéuticos activos de diferente estructura molecular.

De preferencia, la forma cristalina tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura, como se indica por menos del 10 %, de preferencia menos del 5 %, y de una manera muy preferible menos del 2 % del área pico total en el patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) experimentalmente medido que se presenta a partir de los picos extras que están ausentes del patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) simulado. Más preferiblemente, una forma cristalina que tiene una homogeneidad de fases sustancialmente pura con menos del 1 % del área pico total en el patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) experimentalmente medido que se presenta a partir de los picos extras que están ausentes del patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) simulado.

El término "esencialmente igual" con la referencia a las posiciones de los picos de la difracción de rayos-X, significa que se toman en cuenta la posición de picos típica y la variabilidad en la intensidad variabilidad. Por ejemplo, una persona experta en la materia apreciará que las posiciones de picos (2θ) mostrarán alguna variabilidad inter-aparato, típicamente de tanto como 0.2° . Además, una persona experta en la materia apreciará que las intensidades relativas de los picos mostrarán una variabilidad inter-aparato, así como una variabilidad debida al grado de cristalinidad, a la orientación preferida, a la superficie de la muestra preparada, y a otros factores conocidos por los expertos en este campo, y se debe tomar como una medida cualitativa solamente.

Preparación de materiales cristalinos (para propósitos de referencia):

Las formas cristalinas se pueden preparar mediante una variedad de los métodos, incluyendo, por ejemplo, cristalización o recristalización a partir de un solvente adecuado, sublimación, crecimiento a partir de una fusión, transformación en estado sólido a partir de otra fase, cristalización a partir de un fluido supercrítico, y aspersión de chorro. Las técnicas para la cristalización o recristalización de las formas cristalinas a partir de una mezcla de solventes incluyen, por ejemplo, evaporación del solvente, disminuir la temperatura de la mezcla de solventes, siembra del cristal a la mezcla de solventes supersaturada de la molécula y/o de la sal, secado por congelación de la mezcla de solventes, y adición de anti-solventes (contra-solventes) a la mezcla de solventes. Se pueden emplear técnicas de cristalización de alta producción para preparar las formas cristalinas, incluyendo los polimorfos.

Los cristales de los fármacos, incluyendo los polimorfos, los métodos de preparación, y la caracterización de los cristales del fármaco, se discuten en *Solid-State Chemistry of Drugs*, S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, y J.G. Stowell, Segunda Edición, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

Para las técnicas de cristalización que emplean solvente, la elección del solvente o de los solventes típicamente depende de uno o más factores, tales como la solubilidad del compuesto, la técnica de cristalización, y la presión de vapor del solvente. Se pueden emplear combinaciones de solventes, por ejemplo, el compuesto se puede solubilizar en un primer solvente para proporcionar una solución, seguido por la adición de un anti-solvente para disminuir la solubilidad del compuesto en la solución y para proporcionar la formación de cristales. Un anti-solvente es un solvente en donde el compuesto tiene una baja solubilidad.

En un método para preparar cristales, un compuesto se suspende y/o se agita en un solvente adecuado para proporcionar una pasta acuosa, la cual se puede calentar para promover la disolución. El término "pasta acuosa", como se utiliza en la presente, significa una solución saturada del compuesto, que también puede contener una cantidad adicional del compuesto para proporcionar una mezcla heterogénea del compuesto y un solvente a una temperatura dada.

Se pueden agregar cristales de siembra a cualquier mezcla de cristalización para promover la cristalización. La

siembra se puede emplear para controlar el crecimiento de un polimorfo particular, o para controlar la distribución de tamaños de partículas del producto cristalino. De conformidad con lo anterior, el cálculo de la cantidad de semillas necesarias depende del tamaño de la siembra disponible y del tamaño deseado de una partícula de producto promedio, como se describe, por ejemplo, en "Programmed Cooling of Batch Crystallizers", J.W. Mullin y J. Nyvlt, *Chemical Engineering Science*, 1971, 26, 369-377. En general, se necesitan semillas de un tamaño pequeño para controlar efectivamente el crecimiento de los cristales en el lote. La siembra de tamaño pequeño se puede generar mediante la tamización, molienda, o micronización de cristales grandes, o mediante la micro-cristalización de soluciones. Se debe tener cuidado de que la molienda o la micronización de los cristales no dé como resultado ningún cambio en la cristalinidad a partir de la forma deseada del cristal (es decir, un cambio hasta amorfa o hasta otro polimorfo).

Una mezcla de cristalización enfriada se puede filtrar al vacío, y los sólidos aislados se pueden lavar con un solvente adecuado, tal como un solvente de recristalización frío, y se seca bajo una purga de nitrógeno para proporcionar la forma cristalina deseada. Los sólidos aislados se pueden analizar mediante una técnica espectroscópica o analítica adecuada, tal como resonancia magnética nuclear en estado sólido, calorimetría de exploración diferencial, difracción en polvo de rayos-X, o similares, para garantizar la formación de la forma cristalina preferida del producto. La forma cristalina resultante típicamente se produce en una cantidad de más de aproximadamente el 70 % en peso de rendimiento aislado, de preferencia más del 90 % en peso de rendimiento aislado, basándose en el peso del compuesto originalmente empleado en el procedimiento de cristalización. El producto se puede co-moler o pasar a través de un tamiz de malla para deshacer los grumos del producto, si es necesario.

Las formas cristalinas se pueden preparar directamente a partir del medio de reacción del proceso final para la preparación de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida. Esto se puede lograr, por ejemplo, empleando, en el paso final del proceso, un solvente o una mezcla de solventes a partir de los cuales se pueda cristalizar la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida. De una manera alternativa, las formas cristalinas se pueden obtener mediante técnicas de destilación o de adición de solvente. Los solventes adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, los solventes no polares y los solventes polares anteriormente mencionados, incluyendo los solventes polares próticos, tales como alcoholes, y los solventes polares apróticos, tales como cetonas.

Se puede determinar la presencia de más de un polimorfo en una muestra mediante técnicas tales como difracción en polvo de rayos-X (XRPD) o espectroscopía en estado sólido de resonancia magnética nuclear. Por ejemplo, la presencia de picos extras en la comparación de un patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) experimentalmente medido con un patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) simulado, puede indicar más de un polimorfo en la muestra. El patrón de difracción en polvo de rayos-X (XRPD) simulado se puede calcular a partir de los datos de rayos-X de un solo cristal, véase Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns", Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (Abril de 1963) o el programa TOPAS (Total Pattern Analysis Solution, disponible en Bruker AXS Inc.).

Se pueden emplear diversos métodos analíticos para la caracterización.

I. Mediciones de difracción en polvo de rayos-X

Una persona de experiencia normal en la técnica apreciará que se puede obtener un patrón de difracción de rayos-X con un error de medición dependiente de las condiciones de medición empleadas. En particular, en general se sabe que las intensidades en un patrón de difracción de rayos-X pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de medición empleadas. Se debe entender además que también pueden variar las intensidades relativas dependiendo de las condiciones experimentales y, de conformidad con lo anterior, no se debe tomar en cuenta el orden exacto de intensidad. Adicionalmente, un error de medición del ángulo de difracción para un patrón de difracción de rayos-X convencional es típicamente de aproximadamente el 5 % o menos, y se debe tomar en cuenta ese grado del error de medición como perteneciente a los ángulos de difracción anteriormente mencionados. En consecuencia, se debe entender que las formas de cristal de la presente invención no están limitadas a las formas de cristal que proporcionan patrones de difracción de rayos-X completamente idénticos a los patrones de difracción de rayos-X ilustrados en las Figuras acompañantes que se dan a conocer en la presente. Cualesquiera formas de cristal que proporcionen patrones de difracción de rayos-X sustancialmente idénticos a aquéllos que se dan a conocer en las Figuras acompañantes caen dentro del alcance de la presente invención. La capacidad para aseverar las identidades sustanciales de los patrones de difracción de rayos-X está dentro del alcance de una persona con experiencia normal en la técnica.

II. Calorimetría de exploración diferencial (DSC)

El instrumento de calorimetría de exploración diferencial (DSC) utilizado para probar las formas cristalinas fue un TA Instruments® Differential Scanning Calorimetry Modelo 2910, un TA Instruments® Modulated Differential Scanning Calorimetry Modelo 2920, o un TA Instruments® Modulated Differential Scanning Calorimetry Modelo Q1000. La celda/cámara de muestras de la calorimetría de exploración diferencial (DSC) se purgó con 100 mililitros / minuto de gas de nitrógeno de ultra-alta pureza. El instrumento se calibró con indio de alta pureza. La precisión de la

temperatura medida de la muestra con este método está dentro de aproximadamente + 1°C, y el calor de la fusión se puede medir dentro de un error relativo de aproximadamente +5 %. La muestra se colocó en una bandeja de calorimetría de exploración diferencial (DSC) de aluminio abierta, y se midió contra una bandeja de referencia vacía. Se colocaron de aproximadamente 2 a 6 miligramos del polvo de muestra en el fondo de la bandeja, y se golpeó ligeramente hacia abajo para hacer contacto con la bandeja. El peso de la muestra se midió precisamente y se registro hasta una centésima de miligramo. El instrumento se programó para calentar a 10°C por minuto en el intervalo de temperatura de entre 25°C y 300°C.

El flujo de calor, el cual se normalizó por un peso de la muestra, se graficó contra la temperatura medida de la muestra. Los datos se reportaron en unidades de watts/gramo ("W/g"). La gráfica se hizo con los picos endotérmicos señalando hacia abajo. El pico de fusión endotérmico se evaluó para la temperatura de establecimiento extrapolada, la temperatura pico, y el calor de fusión en este análisis.

III. Análisis termogravimétrico (TGA)

El instrumento del análisis termogravimétrico (TGA) utilizado para probar las formas cristalinas fue un TA Instruments.RTM. High Resolution Thermogravimetric Analyzer Q500, o un TA Instruments. RTM. High Resolution Thermogravimetric Analyzer 2950. Las muestras de 15 a 20 miligramos se analizaron a una velocidad de calentamiento de 10°C por minuto en el intervalo de temperatura de entre 25°C y aproximadamente 300°C.

Ejemplos

La invención se ilustra, pero de ninguna manera se limita, mediante los siguientes ejemplos.

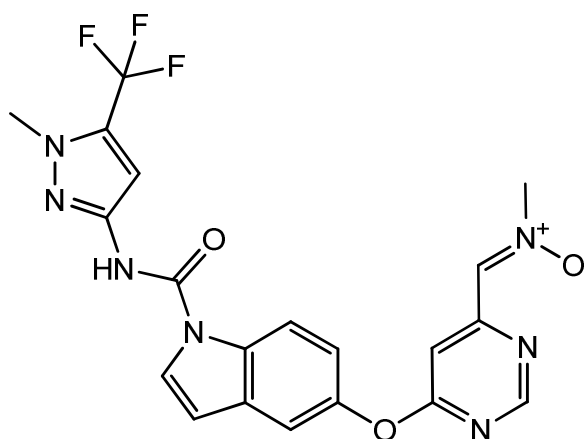
Abreviaturas

20	ACN	acetonitrilo
	app	aparente
	aq acuoso	
	atm	atmósfera
	ATP	5'-trifosfato de adenosina
25	BOC	terbutil-carboxilo
	BOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetil-amino)-fosfonio
	br amplio	
	BSA	albúmina de suero bovino
	d doblete	
30	DBU	1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno
	DCE	1,2-dicloro-etano
	dd doblete de dobletes	
	DCM	dicloro-metano (DCM)
	DIEA	di-isopropil-etil-amina
35	DMAP	4,4-dimetil-amino-piridina
	DME	1,4-dimetoxi-etano
	DMF	N,N-dimetil-formamida
	DMP ona	reactivo Dess-Martin; 1,1,1-triacetoxi-1,1-dihidro-1,2-benzodioxol-3(1H)-
40	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	DTT	ditioeritritol
	EDTA	ácido etilen-diamina-tetra-acético

	ESI	ionización por electroaspersión
	EtOAc	acetato de etilo
	FCC	cromatografía en columna por evaporación instantánea
	g gramos	
5	<i>g (cursiva)</i>	constante de aceleración gravitacional
	GSH	glutathione
	h hora(s)	
	HATU uronio-metanaminio	hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -7-aza-benzotriazol-1-il)--1,1,3,3-tetrametil-
10	HBTU benzotriazolio	(1-)-3-óxido de hexafluorofosfato de 1-[bis-(dimetil-amino)-metilen]-1 <i>H</i> -
	HOBt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento
	IR espectroscopía infrarroja	
15	LCMS	cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas
	LTMP	2,2',6,6'-tetrametil-piperidina de litio
	M molar	
	m multiplete	
	MeOH	metanol
20	min	minutos
	mL mililitro(s)	
	mmol	milimoles
	MSespectrometría de masas	
	MsOH	ácido metan-sulfónico
25	m/z	proporción de la masa a la carga
	N normal	
	NADPH	fosfato de dinucleótido de beta-nicotinamida, forma reducida
	RMN	resonancia magnética nuclear
	Pd/C	paladio sobre carbón
30	ppm	partes por millón
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfonio
	rac	racémico
	rt	temperatura ambiente
	R _t	tiempo de retención
35	s	singulete
	sat	saturado
	SFC	cromatografía de fluidos supercríticos

t	triplete
TBSCI	cloruro de terbutil-dimetil-sililo
TFA	ácido trifluoro-acético
THF	tetrahidrofurano
5 UDPGA	5'-difosfo-alfa-D-ácido glucurónico de uridina

Ejemplo 1 – Preparación de óxido de (Z)-N-((6-((1-((1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-carbamoi)-1H-indol-5-il)-oxi)-pirimidin-4-il)-metilen)-metanamina

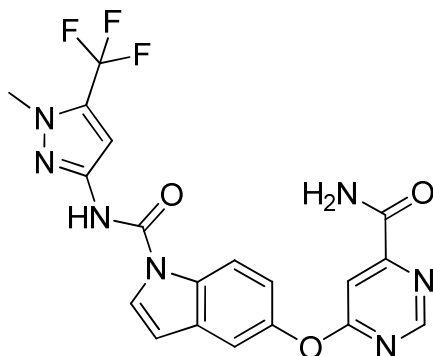


10 A una suspensión de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida (3.06 gramos, 6.87 milimoles), preparada como se describe en la Publicación Internacional Número WO2010066684, en acetonitrilo (140 mililitros), a temperatura ambiente, se le agregó una solución al 30 % en peso de H₂O₂ en agua (147 mililitros, 1,443 milimoles). La reacción se dejó agitando durante tres horas. La mezcla entonces se diluyó con 500 mililitros de dicloro-metano (DCM) seguidos por 400 mililitros de agua, y las capas resultantes se separaron. La capa acuosa se extrajo con 250 mililitros adicionales de dicloro-metano (DCM).

15 Las capas orgánicas se combinaron y luego se lavaron sucesivamente con salmuera (150 mililitros), luego con NaHSO₃ saturado (150 mililitros), y entonces una vez más con salmuera (150 mililitros). La fase orgánica entonces se secó sobre Na₂SO₄ granular, se filtró, y se concentró. El residuo resultante se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna por evaporación instantánea en gel de sílice (del 0 al 10 % de metanol (MeOH) en dicloro-metano (DCM)), y entonces se purificó adicionalmente mediante precipitación a partir de una solución caliente (a aproximadamente 60°C) de acetato de etilo mediante la adición lenta de heptanos, seguida por un enfriamiento lento hasta la temperatura ambiente. El sólido resultante se recolectó mediante filtración, y se lavó con 2:1 de heptano:acetato de etilo frío, para proporcionar el óxido de (Z)-N-((6-((1-((1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-carbamoi)-1H-indol-5-il)-oxi)-pirimidin-4-il)-metilen)-metanamina en un 25 % de rendimiento. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.07 (s, 1H), 8.78 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.42 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.49 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 2.3, 8.8 Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 6.77 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.89 (s, 3H). HRMS: C₂₀H₁₇F₃N₇O₃ calculada 460.1345, encontrada 460.1341.

25

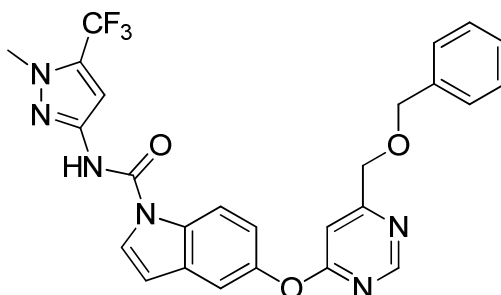
Ejemplo de referencia 2 – Preparación de 5-((6-carbamoi-pirimidin-4-il)-oxi)-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-1H-indol-1-carboxamida



A una solución de la 5-((6-(hidroxi-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-1H-indol-1-carboxamida (700 miligramos, 1.619 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (20 mililitros), se le agregó peryodinato Dess-Martin (1030 miligramos, 2.429 milimoles). La reacción se agitó durante 2 horas. En este punto, se agregó una solución acuosa saturada de NaHCO₃. Las capas se separaron y los materiales orgánicos se extrajeron con dicloro-metano (DCM). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio, y se evaporaron. Al residuo resultante se le agregó tBuOH (16 mililitros)/H₂O (4 mililitros), seguido por clorito de sodio (946 miligramos, 8.37 milimoles), fosfato diácido de sodio (1,004 miligramos, 8.37 milimoles), y 2-metil-2-butenol (6.65 mililitros, 62.7 milimoles). La reacción se agitó durante 4 horas. En este punto, a un pH de 7.4, se agregó una solución de regulador de fosfato, y el producto se extrajo con EtOAc. A una porción de la mezcla cruda (100 miligramos, 0.224 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (2 mililitros) a 0°C, se le agregaron cloruro de oxalilo (0.029 mililitros, 0.336 milimoles) y N,N-dimetil-formamida (DMF) (1.735 microlitros, 0.022 milimoles). Después de 2 minutos, se agregó amoníaco 0.5 M en dioxano (13.44 mililitros, 6.72 milimoles), y la reacción se calentó hasta la temperatura ambiente, y se agitó durante la noche. La reacción se evaporó y se purificó directamente utilizando FCC eluyendo con heptano:EtOAc, de 100:0 a 0:100. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 11.07 (s, 1 H) 8.87 (d, J = 1.01 Hz, 1 H) 8.34 (d, J = 8.84 Hz, 1 H) 8.28 (s, 1 H) 8.20 (d, J = 3.79 Hz, 1 H) 7.97 (s, 1 H) 7.53 (d, J = 2.02 Hz, 1 H) 7.41 (d, J = 1.01 Hz, 1 H) 7.19 (dd, J = 9.09, 2.53 Hz, 1 H) 7.08 (s, 1 H) 6.78 (d, J = 3.79 Hz, 1 H) 3.95 (s, 3 H). MS (ESI+) m/z 445.93 (M+H).

Ejemplo de referencia 3 – Preparación de 5-(6-(amino-metil)-pirimidin-4-iloxi)-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-1H-indol-1-carboxamida

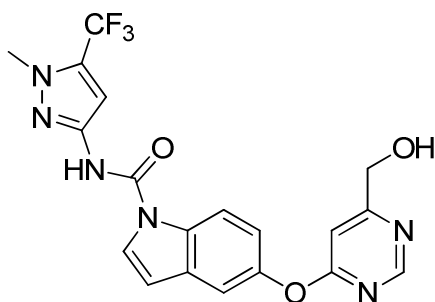
a) 5-(6-(benciloxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-1H-indol-1-carboxamida



A una solución del 5-((6-((benciloxi)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol (2.88 gramos, 8.69 milimoles), preparado como se describe en la Publicación Internacional Número WO010066684, y (1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-carbamato de fenilo (3.10 gramos, 10.86 milimoles), preparado como se describe en la Publicación Internacional Número WO010066684, en N,N-dimetil-formamida (DMF) (87 mililitros), bajo nitrógeno a 0°C, se le agregó NaH (al 60 % en aceite mineral, 1.043 gramos, 26.1 milimoles).

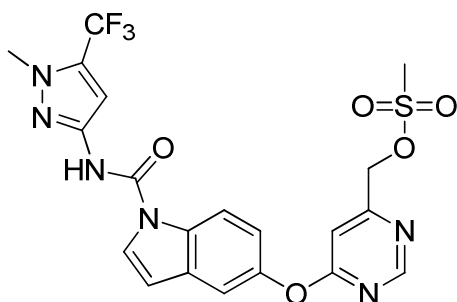
Después de 30 minutos, la reacción se diluyó con acetato de etilo (100 mililitros), y se apagó con 30 mililitros de NH₄Cl acuoso saturado. Se agregó agua (50 mililitros). La capa acuosa se extrajo con otros 50 mililitros, 2 veces, de acetato de etilo. Los materiales orgánicos combinados se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron. El aceite crudo se purificó mediante cromatografía en columna por evaporación instantánea (del 0 al 100 % de acetato de etilo:heptanos), para proporcionar el compuesto del título. MS (ESI+) m/z 523.0 (M+H).

b) 5-(6-(hidroxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-1H-indol-1-carboxamida



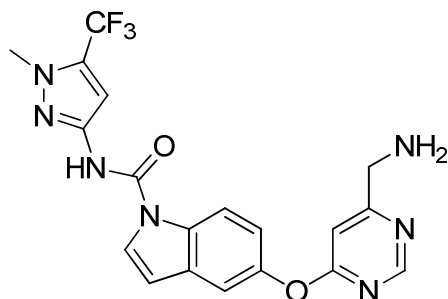
La 5-(6-(benzoxymetil)-pirimidin-4-iloxi)-*N*-(1-metil-5-(tri-fluoro-metil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida (3.26 gramos, 6.24 milimoles) se absorbió en ácido trifluoro-acético (TFA) (100 mililitros), y se calentó a 100°C. Después de 3 horas, la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna por evaporación instantánea (del 0 al 10 % de metanol (MeOH) en dicloro-metano (DCM); el metanol contenía el 10 % de hidróxido de amonio), para proporcionar el compuesto del título. MS (ESI+) m/z 433.0 (M+H).

c) Metan-sulfonato de (6-(1-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1*H*-pirazol-3-il-carbamoil)-1*H*-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metilo



A una solución de la 5-(6-(hidroxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-*N*-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida (0.93 gramos, 2.151 milimoles) en dicloro-metano (DCM) (19.55 mililitros), se le agregaron cloruro de metan-sulfonilo (0.252 mililitros, 3.23 milimoles), trietil-amina (0.599 mililitros, 4.30 milimoles), y DMAP (26 miligramos, 0.213 milimoles). Después de 1 hora, se agregaron cloruro de metan-sulfonilo (0.126 mililitros, 1.61 milimoles) y trietil-amina (0.300 mililitros, 2.15 milimoles) adicionales. Después de 2 horas, la reacción se apagó con agua (20 mililitros), y se extrajo con dicloro-metano (DCM) (10 mililitros, 3 veces), se secó con MgSO₄, se filtró, y se concentró, para dar el compuesto del título. MS (ESI+) m/z 510.9 (M+H).

d) 5-(6-(amino-metil)-pirimidin-4-iloxi)-*N*-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1*H*-pirazol-3-il)-1*H*-indol-1-carboxamida



A una solución del metan-sulfonato de (6-(1-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1*H*-pirazol-3-il-carbamoil)-1*H*-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metilo (107 miligramos, 0.210 milimoles) en tetrahidrofurano (THF) (2.10 mililitros), se le agregó amoníaco (0.5 M en dioxano, 4.192 mililitros, 2.096 milimoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día, y entonces a 40°C durante 1 día. La reacción se concentró y se absorbió en tetrahidrofurano (THF) (2 mililitros) y amoníaco (7 M en metanol (MeOH), 1.50 mililitros, 10.48 milimoles), y se calentó a 35°C durante la noche. La reacción se concentró y se absorbió sobre sílice, para purificarse por medio de FCC (del 0 al 5 % de

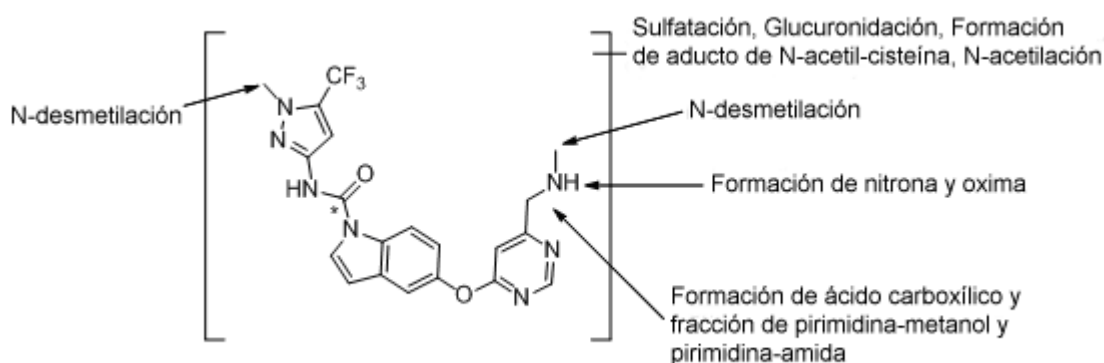
metanol en dicloro-metano (DCM); el metanol contenía el 10 % de hidróxido de amonio). El producto se purificó adicionalmente mediante HPLC (gradiente del 20 al 100 % de acetonitrilo:agua, columna Sunfire C8 OBD 5 micras, 30 x 100 milímetros), para proporcionar el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.65 (s, 1 H) 8.32 (d, J = 8.84 Hz, 1 H) 8.18 (d, J = 3.54 Hz, 1 H) 7.46 (d, J = 2.53 Hz, 1 H) 7.10 - 7.15 (m, 2 H) 7.07 (s, 1 H) 6.76 (d, J = 3.79 Hz, 1 H) 3.95 (d, J = 1.01 Hz, 3 H) 3.82 (s, 2 H). HRMS calculada para C₁₉H₁₆F₃N₇O₂ (M+H)⁺ 432.1396, encontrada 432.1407.

Ejemplo 4 (en la medida en que no se caracteriza el compuesto de la invención, solo para propósitos de referencia) –Aislamiento/caracterización de otros metabolitos de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida

Protocolo *in vitro*

La [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida se incubó con hepatocitos a partir de ratas Sprague-Dawley machos, conejos Nueva Zelanda Blancos machos, monos cinomolgos machos, y seres humanos (hombres y mujeres mixtos) en concentraciones de 10 micromoles/litro durante 6 horas. También se llevaron a cabo incubaciones de 10 micromoles/litro de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida con microsomas hepáticos humanos durante 1 hora. Los incubados se analizaron mediante HPLC con detección de radioactividad. Las estructuras de los metabolitos se caracterizaron mediante LC-MS.

Sendas metabólicas resumidas de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida en hepatocitos y microsomas hepáticos humanos



La [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida, y la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida no radioactivamente marcada, se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO), para obtener soluciones con una concentración de 10 milimoles/litro. Con el objeto de facilitar el análisis de LC-MS, se ajustó el grado de marcado con ¹⁴C en la solución de suministro final a aproximadamente el 50 %. Por consiguiente, se mezclaron 60 microlitros de la solución de [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida con 40 microlitros de la solución de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida no radioactiva. En este estudio se utilizaron los hepatocitos crioconservados descritos en la Tabla 1.

Tabla 1

Origen de los Hepatocitos Usados

Especie	Rata	Conejo	Mono	Humano
Agrupados / No. de donantes	Agrupados / n=14	Agrupados / n=3	Agrupados / n=3	Agrupados / n=20
Raza	Sprague Dawley	Conejo Nueva Zelanda Blanco	Cinomolgo	Mixtos

Género	Macho	Macho	Macho	Mixtos
Proveedor	Celsis	Celsis	Celsis	Celsis
No.de Orden	M00005	M00405	M00305	X008000
Lote	LSC	BMC	OAY	SSY

Los hepatocitos crioconservados se almacenaron en N₂ líquido. En el día de las incubaciones, los hepatocitos se descongelaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Incubaciones de hepatocitos y mediciones de viabilidad

- 5 Después de descongelar los hepatocitos crioconservados, las células viables se enriquecieron mediante centrifugación en el medio de cultivo celular HepatoZYME (Gibco Invitrogen). Para este propósito, las células se agregaron a 45 mililitros de un HepatoZYME tibio a 37°C, y se centrifugaron a temperatura ambiente, a 50 *g* durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía las células muertas se desechó, y las células del aglomerado se volvieron a suspender en HepatoZYME.
- 10 La viabilidad de los hepatocitos resuspendidos se determinó mediante un Mini-Sistema Guava EasyCyte^{MR} utilizando el ensayo ViaCount® como es descrito por el proveedor (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA). Después del recuento de las células, se ajustó la concentración celular a aproximadamente 1•10⁶ células viables/ mililitro mediante la adición de HepatoZYME. Subsiguientemente, las incubaciones se iniciaron mediante la adición de la [1⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida,
- 15 y la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida no marcada, como una solución en sulfóxido de dimetilo (DMSO). La concentración final de sulfóxido de dimetilo (DMSO) en las incubaciones fue del 0.1 % (volumen/volumen).

La concentración inicial de la [1⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida en los incubados fue de 10 micromoles/litro (4.2 kBq/mililitro) para los análisis del patrón del metabolito. Para todas las incubaciones, se utilizaron matraces de cultivo de tejido de 25 mililitros (Becton Dickinson Franklen Lakes), y se tomaron alícuotas de 500 microlitros en los diferentes puntos del tiempo (0 horas y 6 horas).

Con el fin de verificar la estabilidad química de la [1⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida bajo las condiciones de incubación, el compuesto se incubó en una concentración de 10 micromoles/litro en HepatoZYME sin hepatocitos. Se llevó a cabo una segunda serie de incubaciones de control con hepatocitos de todas las especies en ausencia del compuesto de prueba para investigar el efecto de éste último sobre la viabilidad. Estos experimentos se llevaron a cabo en una placa MultiWell^{MR} de 12 x 6 mililitros (Art. 393503, Beckton Dickinson). Otros detalles de las incubaciones se dan en la Tabla 2.

Tabla 2

- 30 Condiciones de Incubación de Hepatocitos para los Patrones de los Metabolitos y Caracterización de las Estructuras de los Metabolitos

Especie		Rata	Conejo	Mono	Humano
Concentración inicial del sustrato	μmol/L	10	10	10	10
Concentración de RA	dpm/mL	7.26x10 ⁵	4.93x10 ⁵	7.31x10 ⁵	6.50x10 ⁵

Especie		Rata	Conejo	Mono	Humano
(medida a las 6 hrs)					
Volumen de solución de sustrato agregada (10 mmol/L en DMSO)	µL	6.35	4.20	4.00	5.95
Concentración inicial de células viables	10 ⁶ /mL	1.00	1.00	1.00	1.00
Viabilidad a las 0 hrs	%	88	70	93	76
Viabilidad a las 6 hrs	%	22	8	42	25
Tiempo de incubación	hrs	6	6	6	6
Volumen de incubación	mL	6.35	4.20	4.00	5.95

Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C bajo una atmósfera humidificada del 95 % de humedad relativa y con CO₂ al 5 % en una incubadora/citoperm Heraeus (Kendro Laboratory Products AG, Zürich, Suiza). Durante las incubaciones, las placas y los matraces se agitaron a 300 recorridos por minuto. La viabilidad de los hepatocitos se determinó después de 6 horas (final de la incubación).

Evaluación de la estabilidad metabólica de la marca radioactiva

Se llevaron a cabo incubaciones adicionales de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida por separado con el objeto de evaluar la estabilidad metabólica de la marca radioactiva. Las incubaciones se llevaron a cabo como se describe anteriormente, pero para los hepatocitos de mono, se utilizó un nuevo lote (SZH). En los puntos del tiempo de las 0, 2, 4, y 6 horas, se pasaron por pipeta alícuotas de 50 microlitros (muestras cuadruplicadas) directamente en frascos Zinsser de 20 mililitros que contenían 10 mililitros de Rialuma (Lumac, Holanda). Se pasaron por pipeta alícuotas de 50 microlitros adicionales (muestras cuadruplicadas) en frascos Zinsser de 20 mililitros, en donde las muestras se secaron durante la noche, antes de mezclarse con 10 mililitros de Rialuma y de sonicarse durante 60 minutos para las mediciones de radioactividad.

Incubación de microsomas hepáticos humanos

En este estudio, se utilizaron los microsomas hepáticos humanos comercialmente disponibles descritos en la Tabla 3. El lote fue caracterizado con respecto a la actividad de diversas enzimas por el proveedor (no se muestran los datos pero están guardados en el archivo). Los microsomas fueron recibidos sobre hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Tabla 3

Datos Técnicos sobre Microsomas Hepáticos

Especie	Humano
Género	Grupo de mujeres y hombres
Proveedor	Gentest
Catálogo /Producto No.	457081
Lote No.	82087 (lote de Novartis Global)
Número de individuos agrupados	50
Contenido de proteína (mg/mL)	20

Incubaciones microsomaes para los patrones de metabolitos

- 5 Se llevaron a cabo incubaciones microsomaes para los perfiles de los metabolitos a 10 micromoles/litro de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida (aproximadamente el 50 % radiomarcada) con un punto del tiempo investigado (60 minutos). Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C en 0.1 mol/litro de regulador de fosfato de sodio, pH de 7.4. Las concentraciones finales en el cóctel de incubación fueron: 4 milimoles/litro de UDPGA (Sigma-Aldrich), 1 milimol/litro de β-NADPH (Sigma-Aldrich), 10 5 milimoles/litro de MgCl₂, y 60 microgramos de alameticina (Sigma-Aldrich) por miligramo de proteína microsomal. El sistema se dejó incubarse durante 10 minutos antes de agregar el compuesto de prueba para permitir la formación de poros con la alameticina. La reacción metabólica se inició mediante la adición de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida, y se terminó mediante la adición de dos volúmenes de acetonitrilo helado. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el 15 análisis. Se llevaron a cabo incubaciones de control en ausencia de microsomas para determinar la estabilidad química de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida en la mezcla de incubación durante 60 minutos.

Tabla 4

Condiciones de Incubación de Microsomas Hepáticos para los Patrones de los Metabolitos y Caracterización de las Estructuras de los Metabolitos

	Unidades	Microsomas hepáticos humanos
Concentración inicial del sustrato	μmol/L	10
Concentración de radioactividad	dpm/mL	6.93x10 ⁵
Volumen de solución de sustrato (10 mmol/L en DMSO) agregada por mL de incubado final	μL	1.0

	Unidades	Microsomos hepáticos humanos
Tiempos de incubación	min	60
Volumen de incubación	mL	1.0

Preparación de Muestras

Compuesto de prueba y condiciones

- 5 Se utilizó una solución de suministro de 10 milimoles/litro de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida en sulfóxido de dimetilo (DMSO) para las incubaciones microsomales y de los hepatocitos.

Tiempos de muestreo

- 10 Se llevaron a cabo los perfiles de metabolitos con todas las especies en el tiempo de las 6 horas de incubación con los hepatocitos, mientras que se llevó a cabo el perfil de metabolitos con microsomos hepáticos humanos en el tiempo de incubación de 1 hora.

Métodos de incubación para los perfiles de metabolitos

- 15 Para las incubaciones de los hepatocitos, la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida se incubó en una concentración inicial de 10 micromoles/litro en un medio de cultivo sin suero (HepatoZYME) con aproximadamente 1×10^6 hepatocitos viables/ mililitro.
- 20 Para las incubaciones de los microsomos hepáticos humanos, la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida se incubó en una concentración inicial de 10 micromoles/litro en regulador de fosfato que contenía 0.5 miligramos de microsomos/litro con los cofactores de NADPH, GSH y UDPGA.
- La caracterización estructural de los metabolitos se llevó a cabo mediante detección de radioactividad en línea y análisis de LC-MS (incluyendo mediciones precisas de masas), utilizando los sobrenadantes de la incubación a partir de los hepatocitos y los microsomos.

Preparación de muestra

- 25 Al final del período de incubación, se mezclaron alícuotas de 500 microlitros de las suspensiones de incubación con dos volúmenes de acetonitrilo helado para detener las reacciones enzimáticas. Las mezclas se mezclaron en vórtex y entonces se almacenaron durante al menos cuatro horas a -20°C hasta el análisis para completar la precipitación de la proteína. Entonces, cada muestra se descongeló y se centrifugó a 10,000 g durante 10 minutos, seguido por la remoción del sobrenadante S1. El sobrenadante S1 se evaporó utilizando un concentrador de muestras, y se almacenó a -20°C hasta su uso adicional. Antes de la inyección de la HPLC, la muestra concentrada se diluyó con la fase móvil A.
- 30 El aglomerado resultante se solubilizó con 500 microlitros de Solvable/isopropanol 2/1 (volumen/volumen), y se neutralizó con 200 microlitros de ácido clorhídrico (2 M).

Mediciones de radioactividad para la determinación de las recuperaciones

- 35 La radioactividad se midió con un Analizador de Centelleos de líquidos (modelo TriCarb 2200CA, Packard Inst.). Se midieron alícuotas (50 microlitros) de las mezclas de incubación después de la adición de 10 a 15 mililitros de cóctel de centelleo (Rialuma). Los aglomerados solubilizados se midieron después de la adición de 17.5 mililitros de cóctel de centelleo (IrgaSafe Plus, Zinsser analítico, Frankfurt, Alemania).

- 40 Para el cálculo de la recuperación total en las incubaciones, los aglomerados se deben solubilizar, y es posible que se pierda alguna radioactividad. Sin embargo, la recuperación de la radioactividad en los aglomerados y los sobrenadantes reconstituidos de las cuatro especies a las 6 horas estuvo en el intervalo de entre el 92.3 % y el 97.7 %, y por consiguiente, se asumió que estaba casi completa.

Se encontró que la radioactividad en los aglomerados de las incubaciones de los hepatocitos fue menor del 1.1 % en todas las muestras a las 0 horas, y menor del 4.5 % a las 6 horas. En los aglomerados de las incubaciones microsomales hepáticas humanas, la radioactividad fue del 0.7 % a las 0 horas, y del 1.3 % a la 1 hora, al final de la

incubación. La radioactividad en los aglomerados de las incubaciones de hepatocitos complementarias estuvo en el intervalo de entre el 4.2 % y el 9.5 % en todas las muestras a las 6 horas.

Viabilidad de los hepatocitos

5 Durante la incubación con la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida (10 micromoles/litro), la viabilidad de los hepatocitos (porcentaje de células viables en relación con las células totales) a partir de rata, conejo, mono, y humano, disminuyó desde inicialmente el 70 al 93 % hasta el 8 al 42 % después de 6 horas. La velocidad de disminución en la viabilidad siguió el orden: (humano ≈ mono) < rata < conejo. Las incubaciones de control en ausencia del compuesto mostraron una viabilidad un poco más baja del 4 al 21 % después de 6 horas.

10 Solución de suministro e incubación de control

La solución de suministro de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida utilizada en el estudio actual se analizó mediante HPLC con detección de radioactividad en línea. La pureza radioquímica fue del 99.6 %. La suma total de todas las impurezas contó por el 0.4 %. Las incubaciones de control de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida en ausencia de hepatocitos o de microsomas hepáticos confirmó la estabilidad del compuesto durante las incubaciones en el medio de incubación.

Protocolo *in vivo*

Animales

Números de licencia de animales

20 No. 18, Kantonales Veterinäramt Basel.

Especies, raza, género

Rata, Wistar (Han:WIST, albino), Rata macho, Brown Norway (BN/Crl, pigmentada), macho.

Proveedor

Han:WIST: Harlan, Holanda BN/Crl: Janvier, Francia.

25 *Agua / alimento*

Acceso libre a agua del grifo y croquetas NAFAG No. 890 (Eberle NAFAG AG, Gossau, Suiza) a través de todo el estudio.

Condiciones ambientales

22 + 2°C

30 Formulaciones

La formulación de prueba fue recién preparada en el día de la administración. La sustancia de fármaco se disolvió en el 10 % de N-metil-pirrolidona (NMP), el 70 % de PEG200 mono-dispersado (tetraetilenglicol), y el 20 % de una solución acuosa de NaCl al 0.9 %. Para 10 miligramos del compuesto, se agregó un gramo de NMP hasta disolver el compuesto, entonces se agregaron sucesivamente 7 gramos de PEG200 y 2 gramos de NaCl al 0.9 %, para alcanzar un total de 10 gramos.

Dosificación

La solución de dosificación (1 gramo/kilogramo) se administró como un bolo en la vena femoral de todas las ratas anestesiadas mediante inhalación de una mezcla de oxígeno/isoflurano (Forene) (97/3, volumen/volumen). La dosis nominal fue de 1 miligramo/ kilogramo.

40 Sangre/plasma

Las muestras de sangre se recolectaron sublingualmente. Para la recolección de las muestras, las ratas se anestesiaron mediante la inhalación de una mezcla de oxígeno/isoflurano (Forene) (97/3, volumen/volumen). La vena sublingual se punzó utilizando una aguja fina, y se recolectó la sangre requerida en frascos de K3-EDTA. El sangrado se detuvo dentro de 10 a 15 segundos oprimiendo un hisopo sobre la herida. Las ratas estuvieron inconscientes durante aproximadamente 2 a 3 minutos para la recolección de las muestras.

La sangre recolectada se centrifugó dentro de 10 minutos después de la recolección (3000 g, 10 minutos, y temperatura ambiente). El plasma se separó, y se removió una alícuota de 20 microlitros, se pesó, y se ensayó para

determinar la radioactividad mediante LSC. El plasma restante se almacenó a aproximadamente -80°C hasta la determinación de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida mediante ABA (Grupos 1, 5a) o IDD (Grupo 2). Para la sangre muestreada en los grupos 3 y 4, se removió una alícuota de 20 microlitros de la sangre recolectada, se pesó, y se ensayó para determinar la radioactividad mediante LSC.

Excreciones, cadáveres, y lavado de jaula

La orina y las heces se recolectaron cuantitativamente a partir de cada rata de los grupos 2 y 5a. La orina se recolectó sobre hielo seco. Las heces se recolectaron a temperatura ambiente. Después de cada recolección de orina, el frasco de recolección se enjuagó con 3 a 5 mililitros de agua que se agregaron a la muestra de orina respectiva. Se removieron dos alícuotas de cada muestra de orina (cada una de aproximadamente 0.05 gramos), se pesaron, y se procesaron para la determinación de la radioactividad. La orina restante se almacenó a aproximadamente -80°C hasta el análisis mediante IDD. Cada muestra de heces se pesó, y se agregó una solución acuosa de carboxi-metil-celulosa al 1 % (aproximadamente 10 veces el peso de las heces), seguida por homogeneización utilizando un homogeneizador de aspas giratorias (Politron). Se removieron tres alícuotas de cada homogenado de heces (cada una de 2 a 3 gramos), se pesaron, y se procesaron para la determinación de la radioactividad después de atrapar el CO₂. El homogenado de heces restante se almacenó a aproximadamente -20°C hasta el análisis mediante IDD.

Los cadáveres se recolectaron en los grupos 2 y 5a al final del estudio. Éstos se procesaron adicionalmente para la determinación de la radioactividad. El lavado de la jaula se obtuvo enjuagando las jaulas con Radiacwash (Biodex Medical Systems, Nueva York, USA; diluido a 1:10), agua, y etanol. Todos los líquidos utilizados para el procedimiento de lavado se recolectaron juntos para la determinación de la radioactividad.

Atrape de CO₂ volátil

Atrape de CO₂ *in vivo*

Las dos ratas 1a y 2a del Grupo 5a se mantuvieron en jaulas de vidrio con el metabolismo adaptado durante 48 horas. Se determinó la radioactividad del ¹⁴CO₂ capturado en los dos medios de atrape de etanolamina:metanol (1:10), y metanol (MeOH), a partir de cada rata, de acuerdo con el programa de muestreo.

Atrape de CO₂ a partir de las heces

Los frascos que contenían los homogenados de heces se abrieron en una cámara mantenida bajo un flujo de aire (de 2.1 a 3.6 mililitros / minuto). El flujo estuvo burbujeando en dos matraces consecutivos que contenían el medio de atrape de etanolamina : metanol (1:10), y metanol (MeOH), respectivamente. Estos medios se procesaron para la determinación de la radioactividad.

Recuento de centelleos de líquidos

La radioactividad en las alícuotas de las muestras biológicas (sangre, plasma, orina, heces, y cadáveres), y de otras muestras (soluciones de dosificación, lavado de jaula, soluciones de atrape), se midió mediante LSC utilizando los contadores de centelleo de líquidos 2,500 TR de Packard Instr. Para la corrección del apagado, se utilizó un método externo convencional. Las curvas de corrección de apagado se establecieron por medio de estándares sellados (Packard Instr.). Se obtuvieron los valores del fondo para cada lote de muestras utilizando muestras de referencia de la matriz respectiva. La LOD se definió como 1.8 veces el valor del fondo. Todas las determinaciones de radioactividad se llevaron a cabo utilizando las muestras ponderadas.

Mediciones de radioactividad durante la preparación de muestras

El contenido de radioactividad en las muestras biológicas y las recuperaciones de radioactividad después de la preparación de las muestras para los patrones de metabolitos se determinaron mediante recuento de centelleos de líquidos como sigue: Se midieron muestras homogéneas (plasma, orina, heces, extractos) directamente en frascos de polietileno antiestático de 20 mililitros (Packard BioScience, Groningen, Holanda) que contenían de 10 a 20 mililitros de cóctel de centelleo de líquidos Irgasafe Plus (Perkin Elmer). Las muestras no homogéneas (heces, aglomerados) se solubilizaron en una mezcla de 0.5 a 2 mililitros de Solvable (Perkin-Elmer) / isopropanol (1:1, volumen/volumen). Después de completarse la disolución, las muestras se neutralizaron con ácido clorhídrico y se mezclaron con 15 a 20 mililitros de cóctel de centelleo de líquidos Rialuma (Zinsser Analytic Maidenhead, Berkshire, Reino Unido (UK)) para el recuento de centelleos de líquidos. La radioactividad en la reserva de heces a las 0 a 48 horas se determinó utilizando el método de atrape de CO₂. Las muestras se ensayaron para determinar la radioactividad de ¹⁴C en un contador de LSC modelo Tri-Carb (Packard Instruments, Meriden, CT, EUA), utilizando un método de proporción convencional externo para la corrección del apagado.

Métodos de preparación de muestras de Plasma (para los patrones de metabolitos)

Para los análisis de los patrones de metabolitos, se prepararon reservas de plasma (volúmenes idénticos, en el

intervalo de 3 a 15 microlitros por punto del tiempo y rata) para los siguientes puntos del tiempo después de dosificación intravenosa (i.v.): (0.083 horas, 0.5 horas, 1 horas, 4 horas, 8 horas, y 24 horas) (n = 4/muestreo). Las muestras de plasma se utilizaron directamente para el análisis de HPLC con detección de la radioactividad. Antes de la inyección sobre la HPLC, se agregaron 20 microlitros de una mezcla que contenía los compuestos de referencia y 230 microlitros del solvente A. La recuperación de la radioactividad mediante la HPLC se midió en una prueba representativa separada con una reserva de plasma de 0.5 horas y de 8 horas (n = 4). La recuperación estuvo en el intervalo de entre el 93.4 y el 106.2 %, respectivamente. Por consiguiente, se demostró que la recuperación de la radioactividad estaba completa.

La recuperación de la radioactividad mediante la HPLC se midió en una prueba representativa separada con una reserva de plasma de 0.5 horas y de 8 horas (n = 4). La recuperación estuvo en el intervalo de entre el 93.4 y el 106.2 %, respectivamente. Por consiguiente, se demostró que la recuperación de la radioactividad estaba completa, para una alícuota ponderada del homogenado de heces (11.72 gramos). La mezcla se puso en vórtex durante 1 minuto, y se sonicó durante 15 minutos, seguido por centrifugación a 2,000 g durante 15 minutos. Entonces el sobrenadante S1 se removió del aglomerado P1. En un segundo paso de extracción, el aglomerado P1 se disolvió en 10 mililitros de agua, y se extrajo con 30 mililitros de acetonitrilo, como se describe anteriormente, proporcionando el sobrenadante S2 y el aglomerado P2. El sobrenadante S2 se removió, y el aglomerado P2 se disolvió en 10 mililitros de agua, y se extrajo una tercera vez con 35 mililitros de metanol, proporcionando el sobrenadante S3 y el aglomerado P3. El rendimiento de la extracción total en los sobrenadantes S1 a S3 fue del 91.3 %. Los sobrenadantes S1 a S3 se combinaron, y se inyectó una alícuota de la mezcla directamente en el sistema de HPLC, seguida por la radiodetección fuera de línea. La recuperación de la radioactividad mediante HPLC, medida en una prueba separada (reserva de heces de 0 a 48 horas), fue del 100.3 % y, por consiguiente, se consideró que estaba completa.

Método de HPLC para la perfilación e identificación de metabolitos

Instrumentación de LC

Sistema de HPLC modelo 1100 (Agilent Technologies), equipado con una bomba capilar binaria modelo G1376A, un desgasificador modelo G1379A, y un detector de arreglo de diodos de UV/VIS modelo G1315B con una celda de flujo estándar de 13 microlitros modelo G1315-60012. Los espectros UV se monitorearon en el intervalo de 200 a 800 nanómetros. _El software de operación para el sistema de HPLC fue el Agilent ChemStation para LC 3D, Rev. B.04.02.

Columna de guarda

Cartucho de Guarda ACE 3 C18, 15 milímetros x 4.6 milímetros de diámetro interno (i.d.), Art. ACE-111-0103GD (ACT, Aberdeen, Escocia).

Columna analítica

ACE 3 C18, 3 micras, 150 milímetros x 4.6 milímetros de diámetro interno (i.d.), Art. ACE-111-1546 (ACT).

Condiciones de la columna

Termostato a 40°C en un enfriador de columna modelo 7955 (Jones Chromatography Ltd., Hengoed, Mid. Glamorgan, Reino Unido)

Volumen de inyección

Se inyectaron volúmenes de hasta 250 microlitros en un ciclo de muestras de 500 microlitros utilizando un automuestreador HTS PAL (CTC, Zwingen, Suiza).

Análisis de HPLC con detección UV

Después de la cromatografía, el efluente se dividió en una proporción de aproximadamente 1:20. La cantidad más pequeña se dirigió hacia la interfase de LC-MS de electroaspersión. La parte más grande se utilizó para la detección UV, seguida por la detección de la radioactividad en línea.

Detección de radioactividad en línea

Se utilizó un monitor de radioactividad de HPLC modelo LB 513 equipado con una celda de flujo modelo Z-500-5 (Berthold Technologies). Por consiguiente, el efluente se mezcló con la mezcla de centelleos de líquidos Rialuma (Perkin Elmer) a una velocidad de flujo de 3 mililitros / minuto. Los cromatogramas se evaluaron utilizando el software RadioStar (Berthold).

Fase móvil

A : Formato de amonio 10 mM más 1 mililitro/litro de ácido fórmico; pH = 3.58.

B : Acetonitrilo más 1 mililitro/litro de ácido fórmico.

Velocidad de flujo

1,000 microlitros/minuto.

Gradiente

- 5 De 0 a 5 minutos: 10 % de B; de 5 a 50 minutos: del 10 al 60 % de B; de 50 a 55 minutos: del 60 al 100 % de B; de 55 a 60 minutos: 100 % de B.

Método de MS para la identificación de metabolitos

Instrumentación de MS

- 10 Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (Q-ToF Premier) (Waters, Manchester, Reino Unido) operado bajo MassLynx, Versión 4.1.

Voltaje del cono

30 V

Energía de colisión

Para la fragmentación de las moléculas en la celda de colisión, se aplicaron energías de colisión de 15 a 35 eV.

- 15 Gas de desolvatación

Nitrógeno

Modo de ionización

Electroaspersión en el modo de ion positivo, interfase de aspersión-Z con opción LockSpray^{MR}.

Medición precisa de masas

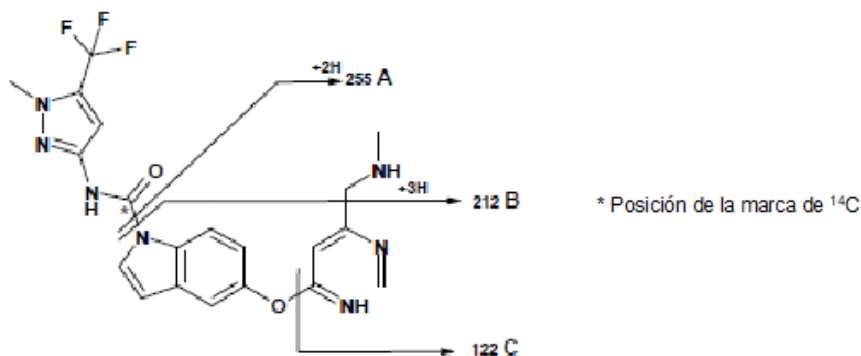
- 20 El canal de referencia de la interfase LockSpray se operó con una solución de leucina-encefalina (200 picogramos/microlitro), en una mezcla de acetonitrilo/agua/ácido fórmico, 50/50/0.1 (volumen/volumen/volumen) a una velocidad de flujo de 5 microlitros/ minuto. Durante la adquisición de los datos a partir del canal de referencia, el voltaje del cono se estableció en 40 V, y la energía de la colisión se estableció en 5 eV.

Temperaturas

- 25 Bloque de la fuente: 100°C; Desolvatación: 200°C.

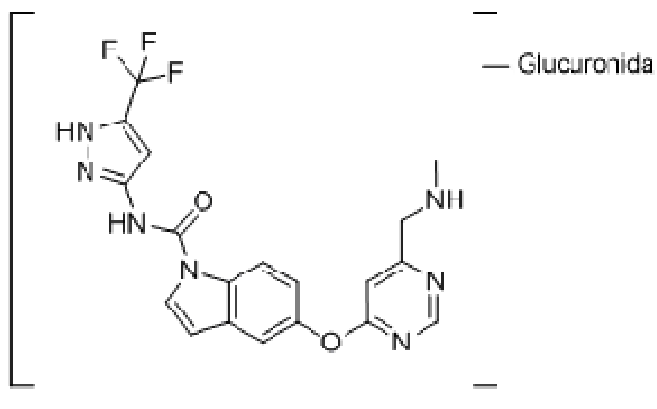
Interpretación de la fragmentación de masas de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida, y nomenclatura de los iones de los fragmentos

- 30 El espectro de masas de electroaspersión de la [¹⁴C]-N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida mostró el ion molecular intacto protonado M+H⁺ (m/z 446), y los dos iones de fragmentos mayores clave A (m/z 255) y B (m/z 212). Hasta un menor grado, la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida se fragmentó en el enlace de éter, conduciendo al fragmento C (m/z 122). Otros fragmentos fueron menos útiles para las asignaciones estructurales. Debido al grado significativo de marcado (aproximadamente el 50 %), se pudieron observar los iones de fragmentos que contenían la marca de ¹⁴C en los espectros de masas, y estuvieron de acuerdo con las estructuras propuestas.

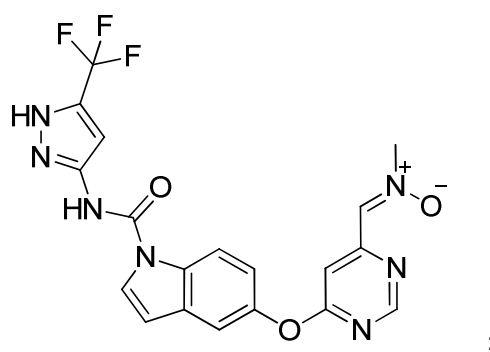
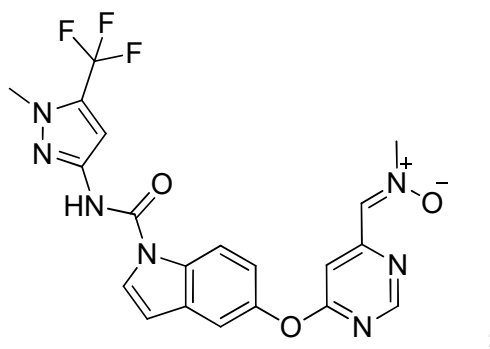


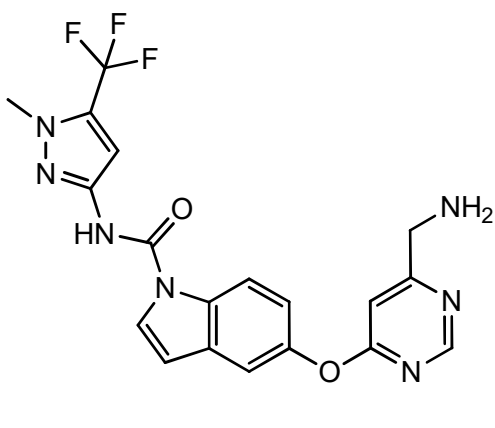
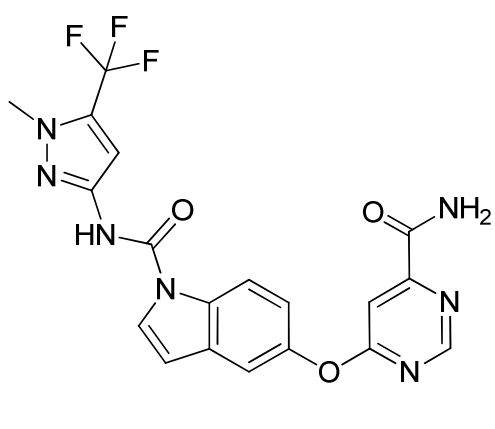
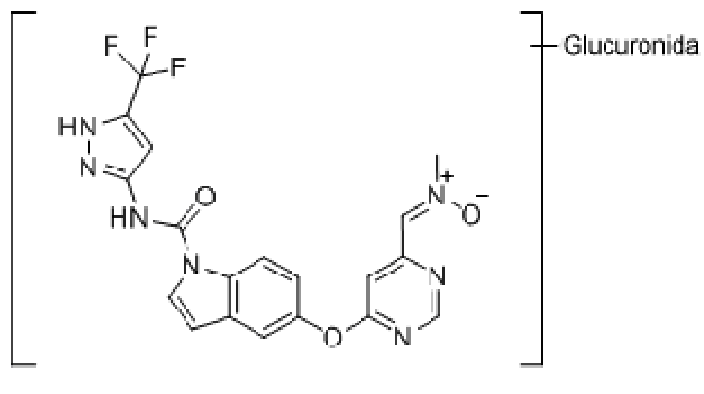
Estructuras propuestas de los metabolitos

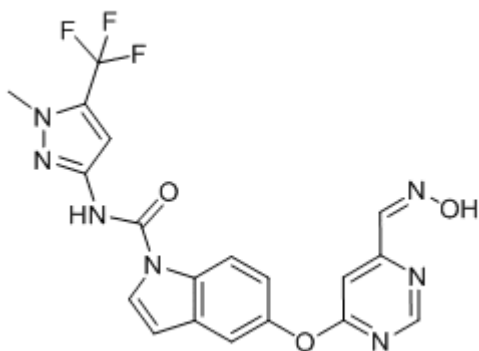
5 Las estructuras de los metabolitos se caracterizaron mediante LC-MS utilizando electroaspersión en el modo de ion positivo. Los datos de los espectros de masas, la interpretación de los fragmentos de masas, y las estructuras propuestas, se ilustran más adelante. Las estructuras de los metabolitos fueron apoyadas por las mediciones exactas de masas y/o mediante los experimentos de intercambio de hidrógeno-deuterio. Los incrementos en la de los iones $M+H^+$ después del reemplazo del H_2O en la fase móvil por D_2O , estuvieron de acuerdo con las estructuras propuestas. Esta asignación de los metabolitos reclamados se confirmó subsiguientemente mediante una comparación de los datos de tiempo de retención y espectros de masas con los compuestos de referencia disponibles.



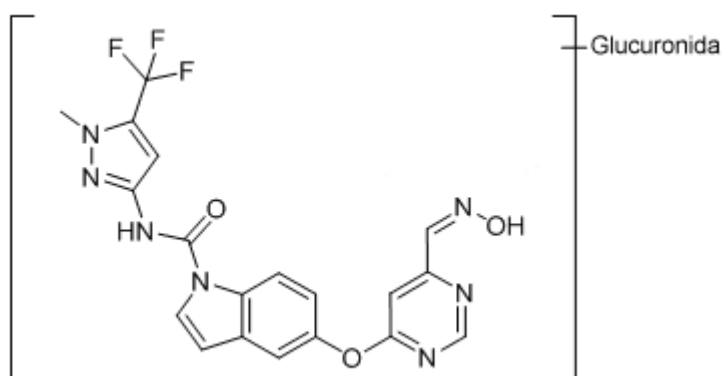
10



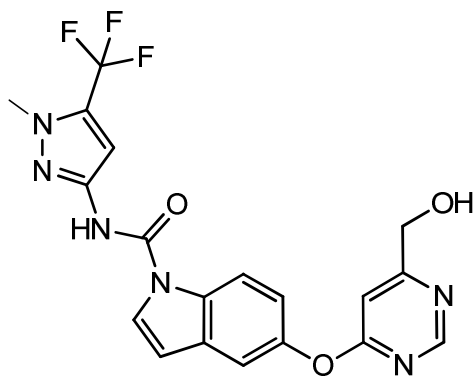




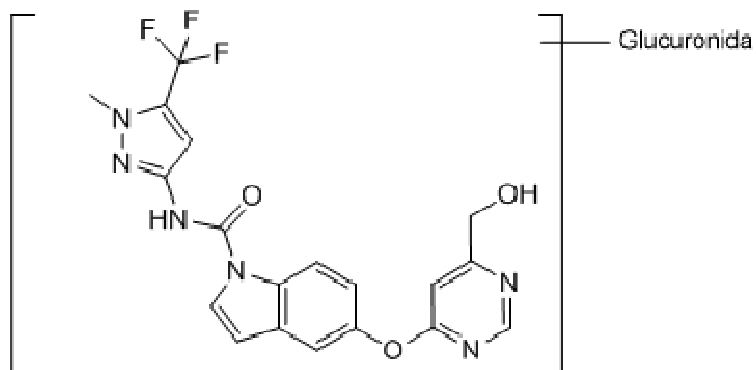
;



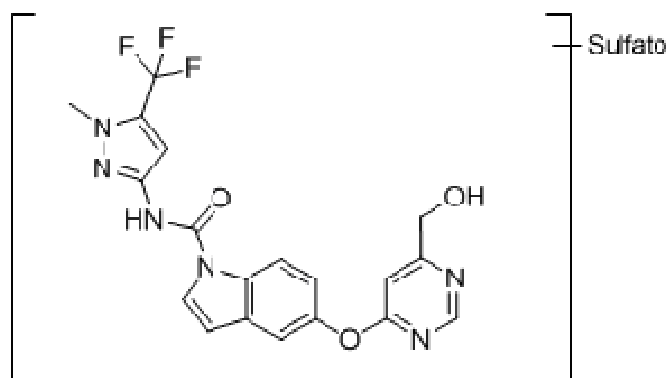
;



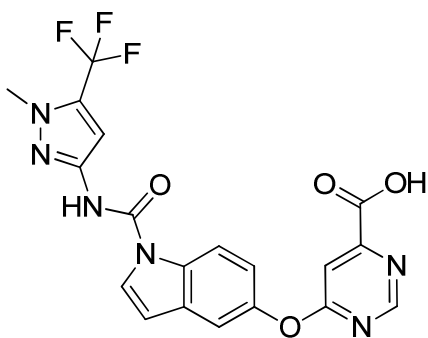
;



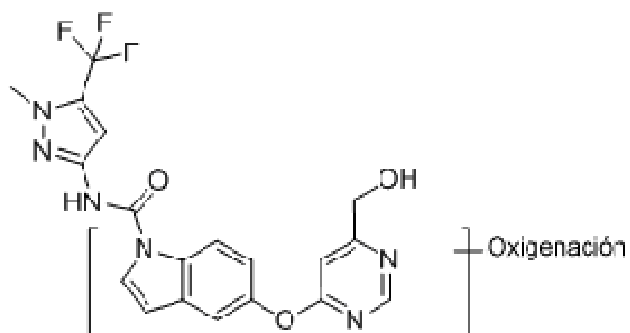
;



;



;y



M18.

Ejemplo de referencia 5 - Preparación de la Forma A de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida (Sal de HCl)

En un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 litros equipado con un agitador mecánico, adaptador de entrada de nitrógeno, termómetro, embudo de adición, y baño de enfriamiento, se colocaron la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida (76.8 gramos, 172.4 milimoles), y etanol (1.5 litros). La pasta blanca se agitó a 20°C durante 30 minutos y se agregó rápidamente HCl 1N (157 mililitros, 157 milimoles) (pH = 5). Se agregó una cantidad adicional de HCl (2 gramos) para reducir el pH hasta 4. La suspensión blanca resultante se agitó a 23°C durante 2 horas, y se diluyó con metil-terbutil-éter (MTBE) (1.5 litros). La mezcla de las dos fases se enfrió hasta 0-5°C, y se agitó a esta temperatura durante 3 horas. Los sólidos se aislaron mediante filtración con succión, se lavaron con metil-terbutil-éter (MTBE) frío (30 mililitros, 2 veces), y se secaron a 55-60°C en el horno al vacío, para proporcionar el clorhidrato de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida (66.9 gramos, 81 %), como un sólido de color bronce.

Esta forma fue cristalina de acuerdo con la difracción en polvo de rayos-X (XRPD) y la calorimetría de exploración diferencial (DSC). La difracción en polvo de rayos-X (XRPD) para la forma A se muestra en la Figura 1. La calorimetría de exploración diferencial (DSC) para la forma A se muestra en la Figura 2.

Tabla 5

Modificación de los picos de difracción en polvo de rayos-X – Forma A

Ángulo	Valor d	Intensidad
2-Theta °	Angstroms	Conteo
6.391	13.83086	35.5
8.6	10.28184	176
9.532	9.27869	30.7
10.333	8.56084	59.9
11.74	7.53827	149
12.691	6.97491	181
13.486	6.56551	55.4
14.767	5.99906	53.9
15.105	5.86554	59.7
15.767	5.62066	140
16.571	5.34982	171

ES 2 699 776 T3

Ángulo	Valor d	Intensidad
2-Theta °	Angstroms	Conteo
16.973	5.22394	65.3
17.39	5.09955	451
17.986	4.9319	124
18.854	4.70665	118
19.427	4.56913	93.7
19.99	4.44181	146
20.472	4.33833	87.6
20.993	4.23179	124
22.593	3.9355	141
23.166	3.83956	193
24.012	3.70603	102
24.413	3.64613	150
25.212	3.53231	54.2
25.788	3.45472	168
26.174	3.4047	164
26.974	3.30548	173
27.245	3.27326	104
28.231	3.16108	54.1
32.809	2.72975	82.6
34.843	2.57491	47.6

Ángulo	Valor d	Intensidad
2-Theta °	Angstroms	Conteo
38.831	2.31912	35.3

Ejemplo de referencia 6 - Preparación de la Forma B de N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida (Sal de HCl)

5 La forma cristalina B de la sal de HCl de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida se obtuvo empleando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 5 anterior. La forma B es una forma transitoria que se convierte de vuelta hasta la Forma A.

Esta forma fue cristalina de acuerdo con la difracción en polvo de rayos-X (XRPD) y la calorimetría de exploración diferencial (DSC). La difracción en polvo de rayos-X (XRPD) para la Forma B se muestra en la Figura 3. La calorimetría de exploración diferencial (DSC) para la Forma A se muestra en la Figura 4.

10

Tabla 6

Modificación de los picos de difracción en polvo de rayos-X – Forma B

2-Theta	Intensidad
8.4113	2029
8.836	579
12.6789	847
13.5686	251
15.7124	598
16.8248	573
17.3911	377
18.7462	251
20.4248	334
21.072	651
24.126	706

2-Theta	Intensidad
24.6518	455
25.2788	441
26.5327	289
27.726	116
35.4721	141

Ejemplo de referencia 7 - Preparación de la Forma A de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina.

5 Hasta ahora se ha descubierto un solo polimorfo cristalino de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina, y se identifica como la Forma A. El polimorfo es un cristal triclinico con grupo de espacio P1. La forma A se ha cristalizado a partir de soluciones de metanol, tetrahidrofurano (THF), acetona, etanol, acetonitrilo, y cloruro de metileno, mediante el método de evaporación, para proporcionar el polimorfo A en concentraciones de 1 miligramo/mililitro. También se ha preparado el polimorfo A de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina mediante el ciclo de calentamiento/enfriamiento utilizando un Cristal 16 en concentraciones >5 miligramos/mililitro en todos los solventes enlistados anteriormente.

El Polimorfo A es altamente cristalino de acuerdo con la difracción en polvo de rayos-X (XRPD) (Figura 5) y con la calorimetría de exploración diferencial (DSC) (Figura 6); el trazo se caracteriza por un evento exotérmico a aproximadamente 195°C. Esta forma tiene una pérdida de peso del 0.6 % al calentarse.

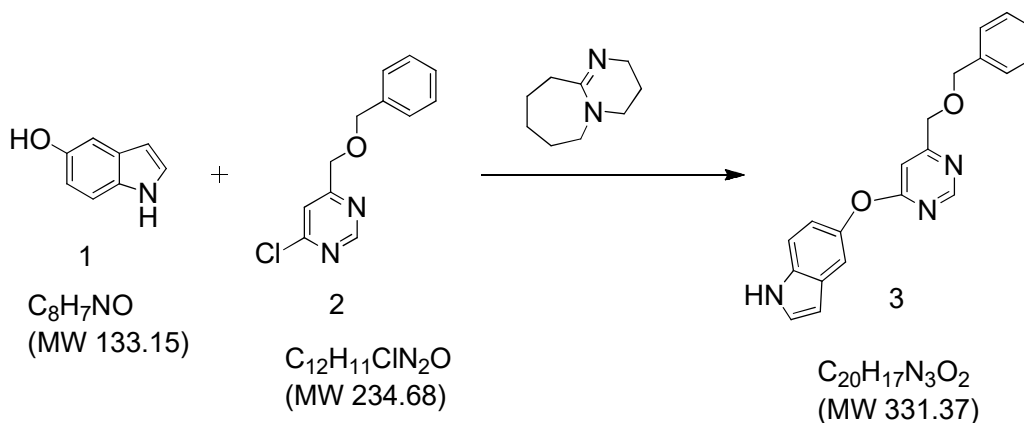
Tabla 7

Modificación A de los picos de difracción en polvo de rayos-X

Ángulo	Valor d	Intensidad
°2θ	Å	%
8.664	10.20635	42.3
16.595	5.34185	50.7
17.423	5.09005	100
18.017	4.92334	49.6
19.448	4.56429	48.0

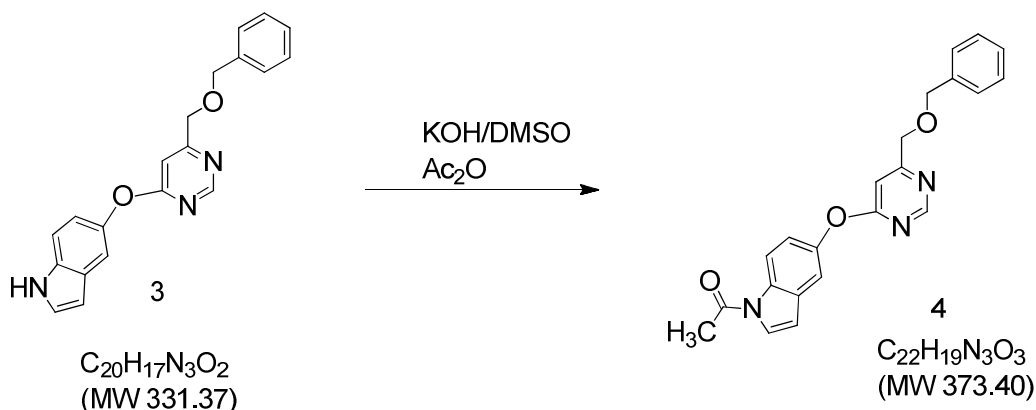
Ángulo	Valor d	Intensidad
$^{\circ}2\theta$	Å	%
20.002	4.43910	57.4
20.468	4.33905	42.5
21.071	4.21625	41.3
22.649	3.92599	58.8
23.215	3.83152	77.9
24.468	3.63800	59.1
25.839	3.44810	63.3

Ejemplo de referencia 8 – Síntesis Química de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida



- 5 A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 litros, equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un manto de calentamiento, un condensador de reflujo, y una entrada de nitrógeno, se le cargaron, a 23°C, el 5-hidroxi-indol (1, 257.7 gramos, 1.94 moles), y acetonitrilo (3 litros). La mezcla oscura se agitó durante 15 minutos. La temperatura interna disminuyó hasta 15°C. Se agregó en una porción la 4-(benziloxi-metil)-6-cloro-pirimidina (2, 386.6 gramos, 1.65 moles). El matraz se enjuagó con acetonitrilo (50 mililitros, 2 veces), el cual se agregó al lote. La mezcla de reacción se calentó a 20°C, y se agregó por goteo el 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno (DBU) (380 gramos, aproximadamente 376 mililitros, 2.5 moles), por medio de un embudo de adición durante 25 minutos. La mezcla de reacción se convirtió desde una mezcla amarillo-bronceada hasta una solución oscura, y se calentó a una temperatura interna de 64–66°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se concentró en un baño a una temperatura de 50°C para remover la mayor parte del acetonitrilo. El residuo se diluyó con metil-terbutil-éter (MTBE) (1.5 litros) y agua (1.2 litros). Las capas se separaron, y la capa acuosa se extrajo con metil-terbutil-éter (MTBE) (500 mililitros, 2 veces). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua (800 mililitros), una solución de
- 10
- 15

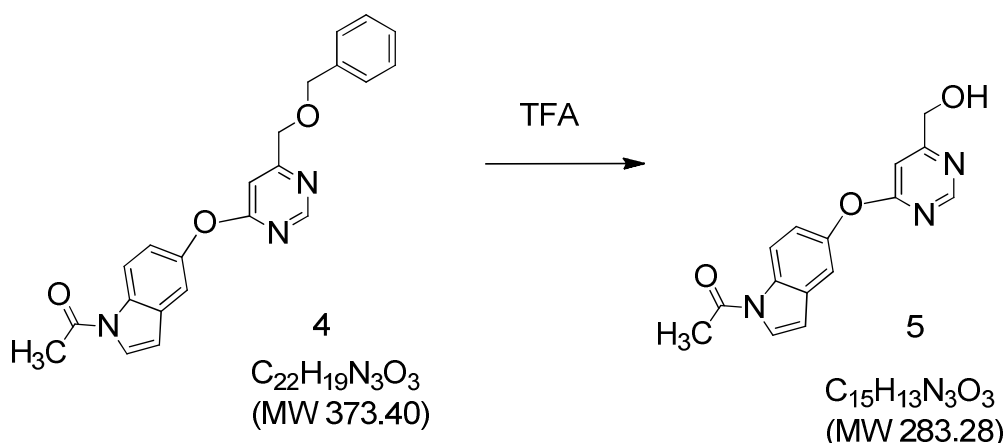
hidróxido de sodio 0.5 N (800 mililitros), y una mezcla de una solución saturada de cloruro de sodio (500 mililitros) y agua (100 mililitros). La capa orgánica se concentró en un baño a una temperatura de 50°C, para proporcionar el 5-(6-(benciloxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol crudo (3, 707 gramos, >100 %), como un líquido viscoso oscuro, el cual se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación.



5

A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 12 litros, equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un baño de enfriamiento, un condensador de reflujo, un embudo de adición, y una entrada de nitrógeno, se le cargaron, a 23°C, el 5-(6-(benciloxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol (3, 706 gramos, 1.65 moles, corregido para la pureza), y sulfóxido de dimetilo (DMSO) (5.1 litros). La mezcla oscura se agitó a 23°C durante 10 minutos, y se agregaron hojuelas de hidróxido de potasio (335.5 gramos, 5.96 moles) en una porción. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla de reacción se enfrió hasta 14-20°C en un baño de agua, y se agregó anhídrido acético (591 gramos, 5.79 moles) por medio del embudo de adición, mientras que se mantenía la temperatura por debajo de 25°C. La temperatura se mantuvo por debajo de 25°C, y la reacción se agitó durante 10 horas. La mezcla de reacción se diluyó con metil-terbutil-éter (MTBE) (3 litros), y se enfrió a 10-15°C. Se agregó agua (2.5 litros) lentamente durante 15 minutos, mientras que se mantenía la temperatura del lote por debajo de 25°C. La mezcla bronceada resultante se agitó a 21°C durante 1 hora, y se dejó reposar durante la noche. La capa acuosa se extrajo con metil-terbutil-éter (MTBE) (1.2 litros, 3 veces). Las capas orgánicas combinadas (aproximadamente 7 litros) se lavaron con una solución saturada de bicarbonato de sodio (1.7 litros), agua (1.5 litros, 3 veces), y cloruro de sodio saturado (1.5 litros). La concentración bajo presión reducida a 50°C dio un líquido viscoso color café oscuro (604 gramos). El material crudo se purificó mediante filtración a través de una columna de gel de sílice, eluyendo con metil-terbutil-éter (MTBE), para proporcionar la 1-(5-(6-(benciloxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-il)-etanona cruda (4, 593 gramos, 96 %), como un aceite color naranja, el cual se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación.

20

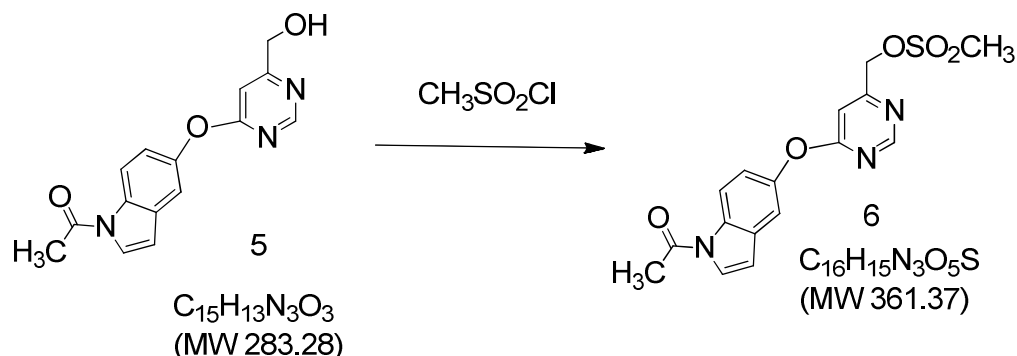


25

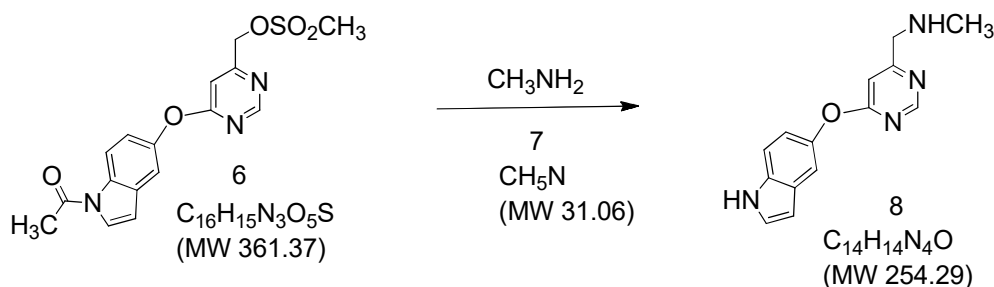
30

A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 1 litro, equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un condensador de reflujo, un manto de calentamiento, y una entrada de nitrógeno, se le cargaron la 1-(5-(6-(benciloxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-il)-etanona (4, 100 gramos, 267.8 milimoles) y tolueno (40 mililitros). La solución se agitó a 23°C durante 10 minutos, y se agregó rápidamente ácido trifluoro-acético (TFA) (368.4 gramos, 3.23 moles). La temperatura del lote se incrementó hasta 45°C durante la adición. La mezcla se calentó hasta 70°C durante 20 horas. Después de enfriarse hasta 23°C, la reacción se diluyó con tolueno (400 mililitros), y se agregó lentamente a una mezcla de bicarbonato de sodio (280 gramos, 3.33 moles), agua (1.2 litros), y tolueno (200 mililitros). La

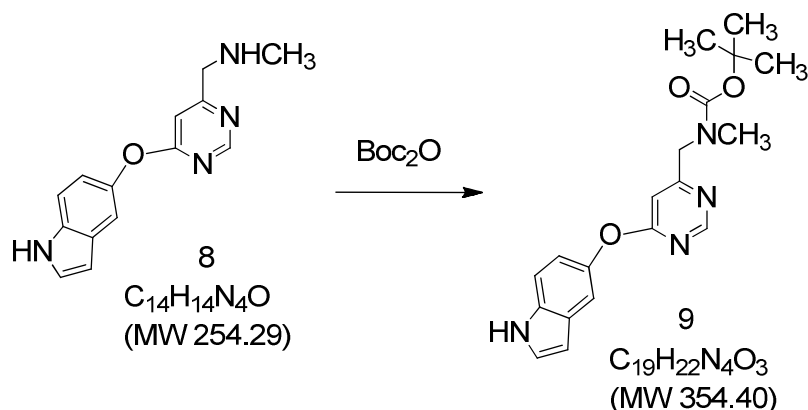
temperatura se mantuvo por debajo de 24°C durante la adición. La pasta amarilla resultante se agitó a 23°C durante la noche (pH = 6). Los sólidos se filtraron con succión, se lavaron con agua (100 mililitros) y tolueno (100 mililitros), y se secaron a 55-60°C en el horno al vacío. El material seco resultante (61.3 gramos) se purificó mediante agitación en acetato de etilo (185 mililitros) a 50°C durante 30 minutos, seguido por 23°C durante 6 horas, y se secó como anteriormente, para proporcionar la 1-(5-(6-(hidroxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-il)-etanona (5, 37.4 gramos, 58 %), como un sólido de color bronce.



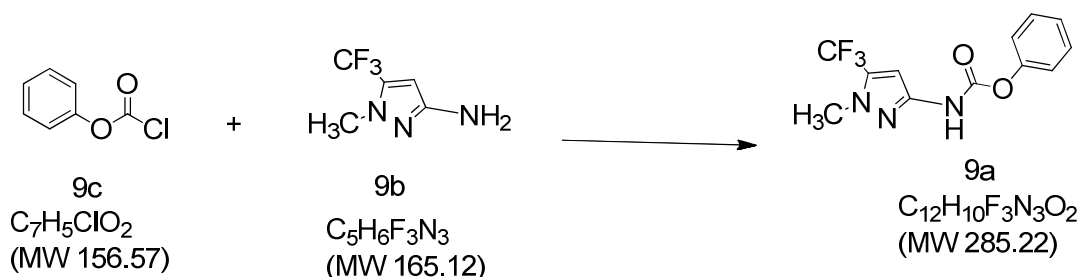
A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 litros, equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un baño de enfriamiento, un embudo de adición, y una entrada de nitrógeno, se le cargaron la 1-(5-(6-(hidroxi-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-il)-etanona (5, 134.2 gramos, 473.7 milimoles) (93 % de pureza), tetrahidrofurano (THF) (2.4 litros) y la 4-dimetil-amino-piridina (DMAP) (6 gramos, 49 milimoles). Después de agitar durante 15 minutos, se agregó, en una porción, trietil-amina (98 gramos, 968.4 milimoles), y la pasta acuosa resultante se enfrió por debajo de 5°C. Se agregó cloruro de metan-sulfonilo (89 gramos, 777 milimoles), durante 25 minutos, mientras que se mantenía la temperatura por debajo de 7°C. La suspensión bronceada se agitó a 0-5°C durante 1.5 horas. Se agregó agua (250 mililitros), y el lote se calentó hasta 23°C. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida (temperatura del baño = 38°C), y el residuo se diluyó con acetato de etilo (500 mililitros). La mezcla se concentró nuevamente, y el residuo se diluyó con acetato de etilo (1 litro) y agua (300 mililitros). Después de agitar durante 5 horas a 23°C, los sólidos resultantes se filtraron con succión, se lavaron con una mezcla de 1:1 de acetato de etilo y agua (60 mililitros, 2 veces), y se secaron bajo presión reducida a 40-50°C hasta obtener un peso constante, para dar el metan-sulfonato de 6-(1-acetil-1H-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metilo (6, 142.2 gramos, 83 %), como un sólido de color bronce. El mesilato (7) se puede purificar adicionalmente mediante agitación en acetato de etilo a 23°C durante 18 horas.



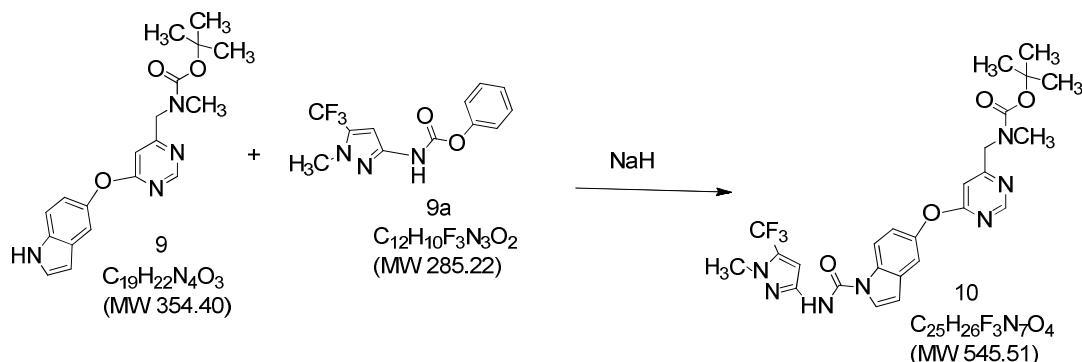
A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 litros, equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un baño de agua, y un adaptador de entrada de nitrógeno, se le cargaron el metan-sulfonato de 6-(1-acetil-1H-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metilo (6, 118.5 gramos, 328.2 milimoles) (95 % de pureza) y la metil-amina en tetrahidrofurano 2 M (THF) (7, 2.04 litros, 4 moles) a 23°C. La solución color naranja claro se agitó a 23°C durante 8 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida a 40°C, y el residuo se diluyó con acetato de etilo (1.2 litros). A 20°C, se agregó una solución de carbonato de sodio (90 gramos) en agua (500 mililitros). La capa orgánica se separó y se lavó con agua (400 mililitros) y cloruro de sodio saturado (400 mililitros). La capa orgánica se concentró bajo presión reducida a 40°C, y los sólidos resultantes se agitaron en acetato de isopropilo (250 mililitros) a 40°C durante 1 hora, y entonces a 23°C durante 6 horas. Los sólidos se aislaron mediante filtración con succión, se lavaron con acetato de isopropilo (15 mililitros, 2 veces), y se secaron bajo presión reducida a 45°C, para dar la 1-(6-(1H-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-N-metil-metanamina (8, 66.4 gramos, 80 %), como un sólido de color bronce.



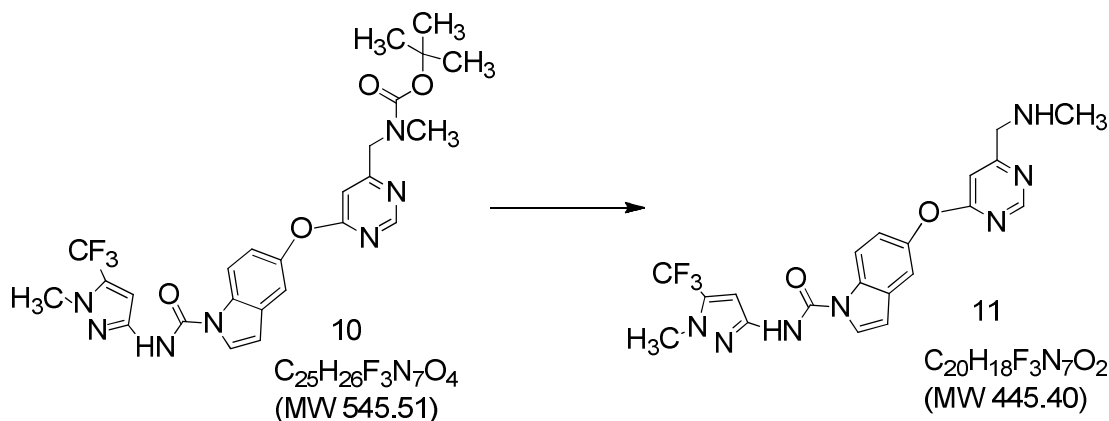
A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 3 litros, equipado con un termómetro, manto de calentamiento, entrada de nitrógeno, condensador de reflujo y embudo de adición, se le cargaron, a temperatura ambiente, la 1-(6-(1H-indol-5-iloxy)-pirimidin-4-il)-N-metil-metanamina (8, 33.2 gramos, 130.561 milimoles), y dicloro-metano (DCM) (1.125 litros). La solución amarilla brumosa se agitó a 23°C durante 10 minutos. A esta mezcla se le agregó, en una porción como un sólido, el dicarbonato de diterbutilo (28.210 gramos, 129.255 milimoles), y la solución se agitó a 23°C durante 12 horas. La solución color naranja nebulosa se filtró a través de un papel filtro y se concentró (38°C/300 mm) hasta obtener una goma color naranja (62.9 gramos). Se agregó acetato de etilo (0.4 litros), y la solución se lavó con amoníaco acuoso al 15 % (125 mililitros), y cloruro de sodio saturado (125 mililitros), y se secó sobre sulfato de sodio. Después de la filtración, la solución se concentró sobre el evaporador giratorio a 40°C/100 mm hasta obtener un aceite color naranja oscuro (46.3 gramos). El aceite se agitó en 1:1 de MTBE/Heptanos (80 mililitros) durante 12 horas, y el sólido amarillo resultante se filtró y se lavó con 2:1 de Heptanos/MTBE (55 mililitros, 2 veces), y se secó en el horno al vacío a 50°C durante la noche, para proporcionar el (6-(1H-indol-5-iloxy)-pirimidin-4-il)-metil-(metil)-carbamato de terbutilo (9, 33.8 gramos, 71 %).



En un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 litros, equipado con un agitador mecánico, entrada de nitrógeno, condensador de reflujo, y termómetro, se colocaron el carbonato-clorato de fenilo (9c, 94 mililitros, 0.75 moles, 117.5 gramos), y tetrahidrofurano (THF) (2,000 mililitros). La solución se calentó a reflujo (a una temperatura interna de 80°C), y se agregó por goteo la 1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-amina (9b, 82.5 gramos, 499.649 milimoles) en tetrahidrofurano (THF) (500 mililitros), durante 30 minutos. La solución color naranja claro se calentó a reflujo durante 16 horas, y se concentró sobre el evaporador giratorio (40°C, 120 mm). El sólido blanco resultante se agitó en heptanos (500 mililitros) durante 30 minutos, se filtró, se lavó con heptanos, y se secó a 50°C en el horno al vacío, para dar el 1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il-carbamato de fenilo (9a, 121.9 gramos, 85 %), como un sólido blanco.



Se suspendió hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60 %) (38.145 gramos, 953.717 milimoles) en tetrahidrofurano (THF) (1,375 mililitros), y se enfrió a 0°C en un baño de hielo. Se agregó por goteo una solución del (6-(1H-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metil-(metil)-carbamato de terbutilo (9,130.000 gramos, 366.814 milimoles) en tetrahidrofurano (THF) (1,375 mililitros), durante 90 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 5°C. La suspensión se convirtió desde gris hasta color naranja. Después de agitar durante 0.5 horas a 0°C, se agregó por goteo una solución del 1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il-carbamato de fenilo (9a, 115.086 gramos, 403.495 milimoles) en tetrahidrofurano (THF) (500 mililitros), durante 60 minutos. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0°C, en cuyo tiempo, se hizo una suspensión color café oscuro (algunos sólidos presentes). Se agregaron acetato de etilo (3,500 mililitros) y cloruro de amonio saturado (1,000 mililitros) a 0°C. Después de agitar durante varios minutos, las capas se separaron, y la capa orgánica se lavó con cloruro de sodio saturado (1,500 mililitros), y se secó sobre sulfato de sodio. La solución de acetato de etilo se filtró a través de gel de sílice 60 (malla de 230-400) y de Celite sobre un embudo Buchner, y el filtrado se concentró hasta obtener un sólido húmedo color beige (aceite a partir del NaH). Se agregó metil-terbutil-éter (MTBE) (625 mililitros), y la mezcla se agitó durante 60 minutos. El sólido resultante se filtró, se lavó con metil-terbutil-éter (MTBE) (250 mililitros, 2 veces), y se secó en el horno al vacío a 50°C, para proporcionar el metil-((6-(1-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il-carbamoyl)-1H-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metil)-carbamato de terbutilo (10) (150.7 gramos, 75 %), como un sólido grisáceo.



En un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 litros, equipado con un agitador mecánico, adaptador de entrada de nitrógeno, termómetro, y embudo de adición, se colocaron el metil-((6-(1-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il-carbamoyl)-1H-indol-5-iloxi)-pirimidin-4-il)-metil)-carbamato de terbutilo (10) (180 gramos, 330 milimoles) y diclorometano (DCM) (2880 mililitros). El sólido se disolvió para formar una solución color naranja claro, y se enfrió hasta por debajo de 5°C. En este punto, se agregó por goteo ácido 2,2,2-trifluoro-acético (TFA) (396 mililitros, 5.34 moles), manteniendo la temperatura por debajo de 5°C. El tiempo de la adición fue de aproximadamente 1.5 horas. El baño de enfriamiento se removió, y la solución se dejó calentar a 22°C y se agitó durante 5.5 horas. La solución se agregó lentamente a una solución de carbonato de sodio (792 gramos) en agua (3,600 mililitros) ($T = 10-15^\circ\text{C}$). Se observó una exotermia ligera y se formó una suspensión blanca. Se dejó agitando durante la noche. La suspensión se filtró, y los sólidos se lavaron con agua (1,500 mililitros, 2 veces). Después de secar al aire sobre el embudo durante varias horas, los sólidos se secaron durante la noche en el horno al vacío a 50°C. Los sólidos secos (356.7 gramos) se dejaron agitando en agua (3,600 mililitros) durante la noche, se filtraron, se lavaron con agua (500 mililitros, 3 veces), y se secaron como anteriormente, para proporcionar la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-(6-

((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-iloxi)-1H-indol-1-carboxamida (11, 120 gramos, 80 %), como un sólido grisáceo.

Ejemplo 9 (en la medida en que no se refiera al compuesto de la invención, para fines de referencia) Actividades de proteína quinasa KDR medidas mediante el método TR-FRET LanthaScreen

5 Se ejecutó un establecimiento genérico del ensayo a temperatura ambiente en un robot de manejo de líquidos. A las placas de ensayo que contenían 50 nanolitros de las soluciones de compuestos o de control, se les agregaron 4.5 microlitros de mezcla de ATP (Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, DTT 1 mM, Tween 20 al 0.025 %, Na₃VO₄ 0.01 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 1 mM, y ATP 4µM) por pozo. Subsiguientemente, se agregaron 4.5 microlitros de mezcla de enzima-sustrato (Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, DTT 1 mM, Tween 20 al 0.025 %, Na₃VO₄ 0.01 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 1mM, albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5 %, poli(EAY) marcado con fluoresceína 100 nM, y KDR 0.76 nM (GST-KDR(807-1356), proteína recombinante internamente producida).

10 El volumen de reacción final es de 9.05 microlitros con concentraciones finales de reactivos de Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, DTT 1 mM, Tween 20 al 0.025 %, Na₃VO₄ 0.01 mM, MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 1 mM, incluyendo una concentración genérica de 2 µM de ATP, 50 nM de poli(EAY) marcado con fluoresceína de sustrato, y 0.38 nM de enzima.

15 Después de 1 hora de incubación, las reacciones de quinasa se detuvieron mediante la adición de 4.5 microlitros de una solución de paro (Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, DTT 1 mM, Tween 20 al 0.025 %, Na₃VO₄ 0.01 mM, EDTA 50 mM), inmediatamente seguida por 4.5 microlitros de una solución de anticuerpos (Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, DTT 1 mM, Tween 20 al 0.025 %, Na₃VO₄ 0.01 mM, 1.72 microgramos/mililitro de Tb-PY20).

20 Después de un tiempo de incubación de 45 minutos en la oscuridad, las placas se transfirieron a un lector de fluorescencia, y se contaron en el modo de fluorescencia resuelta en el tiempo (ajustes de acuerdo con la recomendación del proveedor de los reactivos). El efecto del compuesto sobre la actividad enzimática se obtuvo a partir de la medición del punto final.

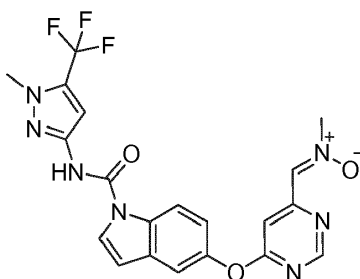
Tabla 4

Valores IC₅₀ para el Ejemplo y dos Ejemplos de referencia

Ejemplo	IC ₅₀
1	< 1 nm
2 (Referencia)	20 nm
3 (Referencia)	< 1 nm

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o sal del mismo,



2. Una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal del mismo, para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mediado por una proteína quinasa en donde la enfermedad es una enfermedad causada por neovascularización ocular.

5. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la enfermedad es la retinopatía diabética.

6. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la enfermedad es la degeneración macular relacionada con la edad.

Figura 5 ilustra los patrones de difracción en polvo de rayos-X de la Forma A de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida.

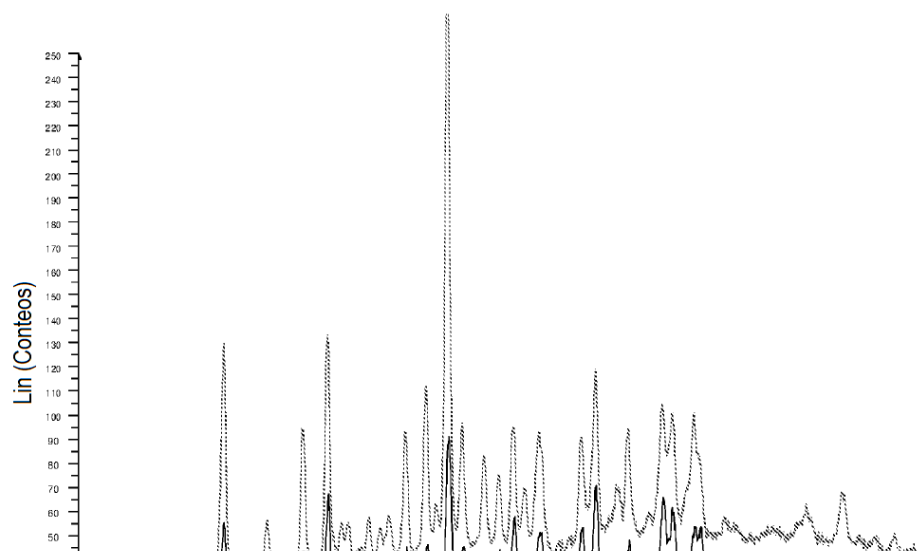


Figura 6 ilustra la calorimetría de exploración diferencial (DSC) de la Forma A de la N-(1-metil-5-(trifluoro-metil)-1H-pirazol-3-il)-5-((6-((metil-amino)-metil)-pirimidin-4-il)-oxi)-1H-indol-1-carboxamida cristalina.

