

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 376**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 405/14** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**A61K 31/454** (2006.01)  
**A61K 31/4545** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2015 PCT/US2015/053098**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057278**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015 E 15777845 (7)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3204377**

54 Título: **Compuestos de aminopiridiloxipirazol**

30 Prioridad:

**07.10.2014 US 201462060724 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BEIGHT, DOUGLAS W.;  
COATES, DAVID A.;  
JOSEPH, SAJAN;  
MCMILLEN, WILLIAM T.;  
PARTHASARATHY, SARAVANAN;  
PEI, HUAXING;  
SAWYER, JASON SCOTT;  
WOLFANGEL, CRAIG D. y  
ZHAO, GAIYING**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 700 376 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

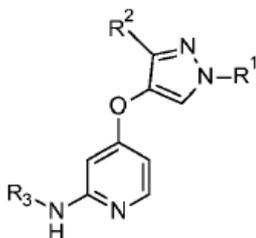
Compuestos de aminopiridiloxipirazol

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de aminopiridiloxipirazol que inhiben la actividad del receptor del factor de crecimiento transformante beta1(TGFβR1), composición farmacéuticas que comprenden los compuestos, y al uso de los compuestos para tratar el cáncer, preferiblemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer pancreático, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer gástrico, y/o fibrosis, preferiblemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta o TGFβ) es una citoquina multifuncional que se une a los complejos heteroméricos de los receptores de serina/treonina quinasa de TGF-beta tipo I y tipo II y activa el complejo del receptor TGF-beta, que fosforila y activa SMAD2 y SMAD3, que luego se asocian con SMAD4 y migran hacia el núcleo y regulan la expresión de diferentes genes blanco. Los actores clave de la vía de transducción de señal del receptor de TGF-beta incluyen TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, TGFβR1, TGFβR2, SMADs, SnoN, SARA, SKI, DAB, TRAP, TAK1, SMIF, E2F4, E2F5, RBL1, RBL2, RB1, TFDP1, TFDP2, SMURF1, SMURF2, P300, CBP, y JUN. La vía del receptor de TGF-beta mediada por SMAD regula diversos procesos celulares y fisiológicos, tales como la proliferación, diferenciación, crecimiento, migración, mielinización, detención del ciclo celular, apoptosis y desarrollo.

Los inhibidores de moléculas pequeñas de TGFβR1 ya son conocidos en la técnica para el tratamiento de cáncer y/o fibrosis. Véase, por ejemplo, los documentos WO2012/002680, WO2009/022171, WO2004/048382 y WO2002/094833. Desafortunadamente, no se conocen tratamientos curativos para muchos tipos de cáncer o fibrosis. Sería deseable tener inhibidores de molécula pequeña adicionales de TGFβR1 para el tratamiento del cáncer, preferiblemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer pancreático, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón, y cáncer gástrico, y/o fibrosis, preferiblemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica, en particular compuestos que son más selectivos para TGFβR1.

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



en la que:

R<sup>1</sup> es hidrógeno, isopropilo, difluorometilo, difluoroetilo, o ciclopropilo;

R<sup>2</sup> es etilo, terc-butilo, piridin-2-ilo, tetrahidropiran-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, ciclopropilo, o ciclobutilo; y

R<sup>3</sup> es carbamoilfenilo, piridin-2-ilo, (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo, 1-metil-2-oxo-1H-piridin-4-ilo, 1-metil-pirazolilo, pirazin-2-ilo, 2-metoxipirimidin-4-ilo, 1-metil-2-oxo-1H-pirimidin-4-ilo, piridazin-3-ilo, 6-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-metoxipiridazin-3-ilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona 4-metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol.

La presente invención también proporciona 4-metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol. La presente invención además proporciona 4-metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol cristalino caracterizado por el patrón de difracción de rayos X (radiación Cu, λ=1,54060 Å) que comprende un pico a 17,8° con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en 19,7°, 18,4°, y 22,0° (2θ ± 0,2°).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de la presente invención, y uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también proporciona un compuesto o sal de la presente invención para usar en tratamientos. Adicionalmente, está invención proporciona un compuesto o sal de la presente invención para uso en el tratamiento del cáncer, preferiblemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer pancreático, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer gástrico y/o fibrosis, preferiblemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica. Además, esta invención proporciona el uso de un compuesto o una sal de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, preferiblemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer pancreático, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer gástrico y/o fibrosis, preferiblemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica. Los siguientes párrafos describen las clases preferidas de la presente invención:

- a) R<sup>1</sup> es difluorometilo, difluoroetilo, o ciclopropilo;
- b) R<sup>2</sup> es piridin-2-ilo, tetrahidropiran-4-ilo, o ciclopropilo;
- c) R<sup>3</sup> es carbamoilfenilo o (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo;
- d) R<sup>1</sup> es ciclopropilo y R<sup>2</sup> es tetrahidropiran-4-ilo;
- e) R<sup>1</sup> es ciclopropilo y R<sup>2</sup> es difluoroetilo;
- f) R<sup>1</sup> es difluoroetilo y R<sup>2</sup> es tetrahidropiran-4-ilo;
- g) R<sup>1</sup> es difluorometilo y R<sup>2</sup> es piridin-2-ilo;
- h) R<sup>1</sup> es ciclopropilo, R<sup>2</sup> es tetrahidropiran-4-ilo, y R<sup>3</sup> es (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo;
- i) R<sup>1</sup> es ciclopropilo, R<sup>2</sup> es difluoroetilo, y R<sup>3</sup> es (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo;
- j) R<sup>1</sup> es difluoroetilo, R<sup>2</sup> es tetrahidropiran-4-ilo, y R<sup>3</sup> es (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo; y
- k) R<sup>1</sup> es difluorometilo, R<sup>2</sup> es piridin-2-ilo, y R<sup>3</sup> es carbamoilfenilo.

El lector experto entenderá que las formas de base libre de los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales y se contempla que tales sales forman parte de la presente invención. Los compuestos de base libre de la presente invención son aminas, y en consecuencia reaccionan con cualquiera de una serie de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Dichas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, P. Stahl, et al, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, enero de 1977. El experto en la materia entiende que la estequiometría de la sal se puede determinar fácilmente. Véase, por ejemplo, D. Risley, et al., Simultaneous Determination of Positive and Negative Counterions Using a Hydrophilic Interaction Chromatography Method, LCGC NORTH AMERICA, Vol 24, No. 8, agosto de 2006, páginas 776-785.

Algunos de los compuestos de la presente invención son cristalinos. Es bien sabido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y el hábito de los cristales. Cuando los efectos de la orientación preferida están presentes, las intensidades de los picos se alteran, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo no cambian. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también es bien sabido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o la humedad a la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En los casos actuales, una variabilidad de posición de pico de  $\pm 0,2$  en  $2\theta$  tendrá en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma de cristal se puede realizar sobre la base de cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de  $^{\circ}2\theta$ ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de la forma del cristal, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustan sobre la base de los picos estándar del NIST 675 en 8,853 y 26,774 grados 2-theta.

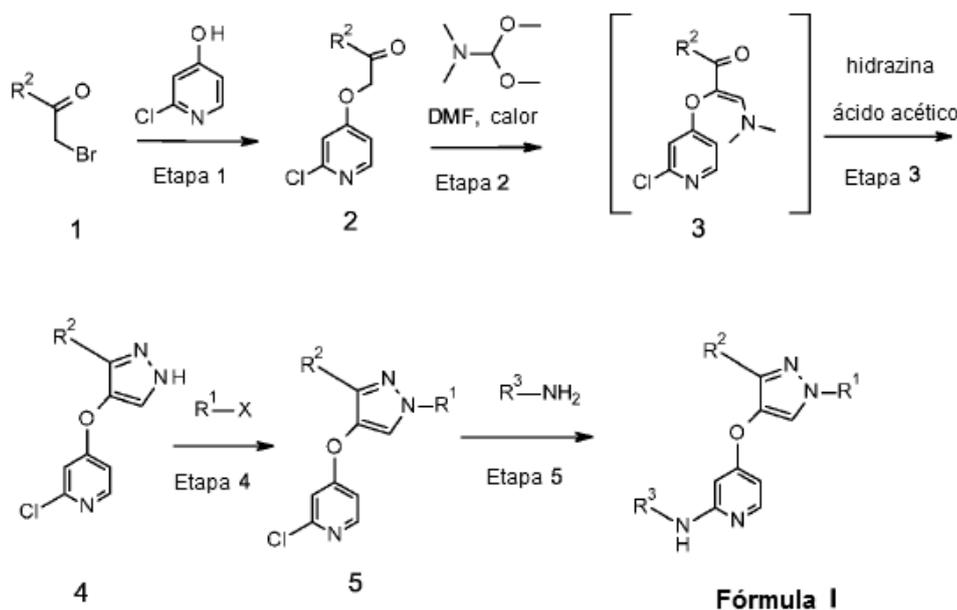
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los siguientes esquemas de síntesis por procedimientos bien conocidos y apreciados en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para las etapas de estos esquemas son bien conocidas en la técnica y las sustituciones apropiadas de disolventes y co-reactivos están dentro de la experiencia de la técnica. Del mismo modo, los expertos en la técnica apreciarán que los intermediarios de síntesis se pueden aislar y/o purificar mediante diversas técnicas bien conocidas, según sea

necesario o deseado, y que, con frecuencia, será posible utilizar diversos intermediarios directamente en las siguientes etapas sintéticas con poca o ninguna purificación. Además, el experto en la materia apreciará que, en algunas circunstancias, el orden en el que se introducen los restos no es crítico. El orden particular de las etapas requeridas para producir los compuestos de la presente invención depende del compuesto particular que se está sintetizando, el compuesto de partida y la carga relativa de los restos sustituidos, como es bien sabido por el químico experto. Todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son como se definieron previamente, y todos los reactivos son bien conocidos y apreciados en la técnica.

Algunos intermediarios o compuestos de la presente invención pueden tener uno o más centros quirales. La presente invención contempla todos los enantiómeros o diastereómeros individuales, así como mezclas de los enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos, incluidos los racematos. Se prefiere que los compuestos de la presente invención que contienen al menos un centro quiral existan como enantiómeros o diastereómeros únicos. Los enantiómeros o diastereómeros únicos se pueden preparar comenzando con reactivos quirales o mediante técnicas de síntesis estereoselectivas o estereoespecíficas. Alternativamente, los enantiómeros o diastereómeros únicos se pueden aislar de las mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatografía quiral estándares. El experto en la materia apreciará que, en algunas circunstancias, el orden de elución de los enantiómeros o diastereómeros puede ser diferente debido a diferentes columnas cromatográficas y fases móviles.

La designación de "isómero 1" en un nombre del compuesto representa que el intermediario o compuesto correspondiente de la presente invención es el primero de los dos enantiómeros que se eluye cuando una mezcla de un par de enantiómeros se separa mediante cromatografía quiral. La designación de "isómero 2" en un nombre del compuesto que representa el intermediario o compuesto correspondiente de la presente invención es el segundo de los dos enantiómeros que se eluye cuando la mezcla de un par de enantiómeros se separa por cromatografía quiral.

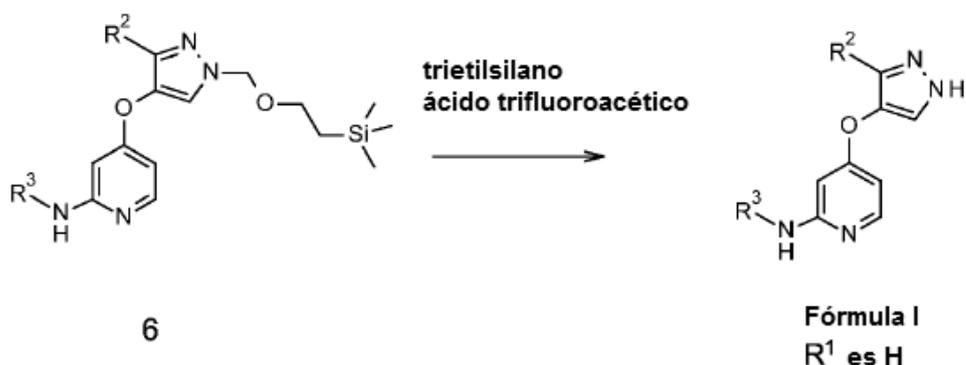
Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar como se ilustra en los siguientes esquemas donde  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^3$  son como se definió previamente.



#### Esquema 1: Síntesis de compuestos de fórmula 1

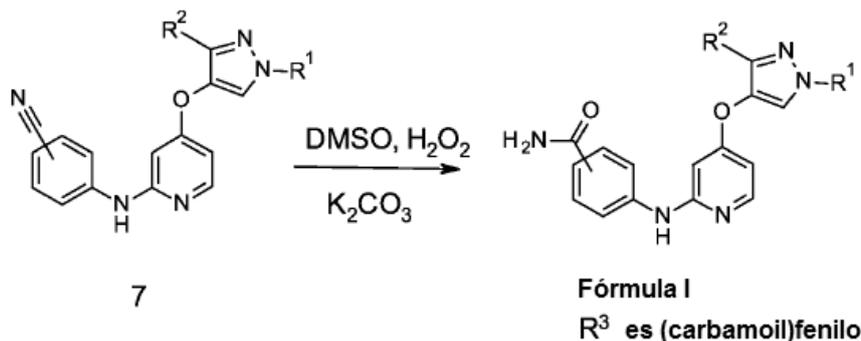
El Esquema 1 ilustra la síntesis general de los compuestos de Fórmula I. El Compuesto 1 se hace reaccionar con 2-cloro-piridin-4-ol en un disolvente adecuado tal como dimetilformamida (DMF) o acetona con una base adecuada tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio en temperatura ambiente o temperatura elevada para proporcionar el Compuesto 2. El Compuesto 2 se hace reaccionar con 1,1-dimetoxi-N,N-dimetilmetanamina a temperatura elevada para formar el Compuesto 3. El Compuesto 3 se puede purificar o usar sin purificación adicional para reaccionar con la hidrazina en ácido acético para proporcionar el Compuesto 4. El Compuesto 4 puede reaccionar con un reactivo de alquilación adecuado tal como alquiltrifluoroborato de potasio o ácido alquilborónico en condiciones de acoplamiento Chan-Lam para formar el Compuesto 5. Más específicamente, primero se calienta una suspensión de 2,2'-bipiridina y acetato de cobre (II) en un disolvente adecuado tal como el

1,2-dicloroetano a temperatura elevada y se purga con nitrógeno, y luego se filtra la mezcla de reacción y se agrega el filtrado a una mezcla del Compuesto 4, un boronato adecuado tal como alquilfluoroborato de potasio o un ácido alquilborónico, y una base adecuada tal como carbonato de sodio en un disolvente adecuado tal como 1,2-dicloroetano. Se calienta la mezcla de reacción a una temperatura elevada para proporcionar el Compuesto 5. El Compuesto 4 también puede reaccionar con un haluro de alquilo adecuado tal como yoduro de alquilo, bromuro de alquilo o cloruro de alquilo con una base adecuada tal como hidruro de sodio en un disolvente apropiado tal como DMF o tetrahidrofurano (THF) para proporcionar el Compuesto 5. El Compuesto 5 se hace reaccionar con una amina adecuada en condiciones de acoplamiento de Buchwald bien conocidas para proporcionar un compuesto de Fórmula I. Más específicamente, el Compuesto 5 se hace reaccionar con una amina adecuada a una temperatura elevada en presencia de una base adecuada, tal como carbonato de cesio, un reactivo de ligando adecuado, como 4,5-bis (difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno, y un catalizador adecuado, tal como acetato de paladio (II) en un disolvente apropiado, como 1,4-dioxano para proporcionar un compuesto de Fórmula I.



**Esquema 2: Síntesis de compuestos de fórmula 1 cuando R<sup>1</sup> es H**

El Esquema 2 ilustra la síntesis general de los compuestos de Fórmula I cuando R<sup>1</sup> es H. Como se ilustra en la etapa 4 del Esquema 1, cuando el reactivo de alquilación es cloruro de 2-(trimetilsilil) etoximetilo, el Compuesto 6 se puede obtener mediante alquilación a través de la etapa 4 y. reacción de acoplamiento Buchwald a través de la etapa 5. El compuesto 6 puede reaccionar con trietilsilano en ácido trifluoroacético para proporcionar un compuesto de Fórmula I en el que R<sup>1</sup> es H. Cuando R<sup>1</sup> es H, los expertos en la materia saben que un compuesto de Fórmula I puede existir como un par de tautómeros en los que el hidrógeno puede migrar entre dos nitrógenos en el anillo pirazolilo.



**Esquema 3: Síntesis de compuestos de fórmula 1 cuando R<sup>1</sup> es (carbamoil)fenilo**

El Esquema 3 ilustra la síntesis general de compuestos de Fórmula I cuando R<sup>3</sup> es un grupo (carbamoil)fenilo. El compuesto 7 se puede preparar mediante el procedimiento ilustrado en la etapa 5 del Esquema 1 cuando R<sup>3</sup> es un benzonitrilo sustituido apropiadamente. El compuesto 7 se hace reaccionar con peróxido de hidrógeno y una base adecuada tal como carbonato de potasio en dimetilsulfóxido (DMSO) para proporcionar un compuesto de Fórmula I cuando R<sup>3</sup> es un grupo (carbamoil)fenilo.

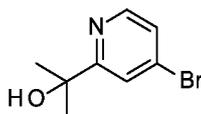
Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados indicados: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a la albúmina sérica bovina; "DCM" se refiere a diclorometano; "DMF" representa N, N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DTT" se refiere a ditiotreitilo; "EDTA" se refiere al ácido etilendiaminotetraacético; "EGTA" se refiere a ácido etilenglicol tetraacético; "ELISA" se refiere a un ensayo de

5 inmuoabsorbancia ligado a enzimas; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero fetal bovino; "HEC" se refiere a la pérdida de hidroxietilcelulosa; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "IVTI" se refiere a la inhibición del blanco in vivo; "MS" se refiere a la espectroscopia de masas; "MeOH" se refiere a metanol; "RMN" se refiere a la resonancia magnética nuclear; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "TBS" se refiere a solución salina tamponada con tris; "TED" se refiere a la dosis efectiva umbral; "UVW" se refiere a la longitud de onda ultravioleta, y "XRD" se refiere a la difracción de rayos X.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en la presente se denominan y numeran usando ACDLABS o Accelrys Draw 4.1.

### 10 Preparación 1

2-(4-Bromo-2-piridil)propan-2-ol



15 Se equipa un balón de tres bocas de tres litros con un embudo de adición, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una sonda de temperatura. Se carga con bromuro de metilmagnesio (3,2M en 2-metiltetrahidrofurano, 239,07 ml, 765,01 mmol) y se enfría en un baño de hielo. Al embudo de adición, se añade una solución de 4-bromopiridin-2-carboxilato de etilo (80,0 g, 347,73 mmol) en THF (800,0 ml). Se añade la solución gota a gota a la solución de bromuro de metilmagnesio mientras se mantiene la temperatura interna por debajo de 25 °C. Se retira el baño de enfriamiento y se deja agitar a 25 °C durante 30 minutos. Se enfría la mezcla de reacción a 5 °C y se inactiva con cuidado con la adición gota a gota de solución acuosa de ácido clorhídrico (1 M) mientras se mantiene la temperatura interna por debajo de 30 °C. Se añade solución acuosa de ácido clorhídrico adicional (1 M) hasta que la mezcla alcanza un pH de alrededor 7. Se retira el baño de enfriamiento y se diluye con acetato de etilo (EtOAc; 200 ml). Se aísla la capa orgánica, se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con EtOAc. Se concentra el filtrado para proporcionar un aceite anaranjado. Se purifica mediante el uso del tapón de gel de sílice que eluye con hexano/EtOAc (3/1) para proporcionar el compuesto del título (63,15 g; 84,0% de rendimiento) como un aceite incoloro. MS (m/z): 216/218 (M+1/M+3).

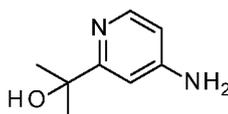
El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento de Preparación 1.

**Tabla 1:**

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
2	2-(5-Bromo-2-piridil)propan-2-ol		MS (m/z): 216/218 (M+1/M+3)

### Preparación 3

30 2-(4-Amino-2-piridil)propan-2-ol



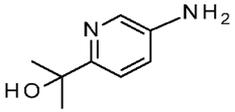
35 Se carga un reactor Parr de dos litros con una barra de agitación, cobre (malla de polvo, 12,6 g, 198,6 mmol), 2-(4-bromo-2-piridil)propan-2-ol (63,1 g, 292,0 mmol) e hidróxido de amonio (28 % p/p en agua 757,2 ml). Se agita la mezcla de reacción al aire libre durante 30 minutos hasta que está azul oscuro. Se retira la barra de agitación, se une una parte superior de agitación mecánica, se sella, y se coloca en un agitador. Se calienta mezcla a 100 °C (interior, baño de calentamiento a 120 °C) y se agita durante la noche. Se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se añade 2-metiltetrahidrofurano (600 ml). Se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con 2-metiltetrahidrofurano. Se aísla la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con 2-metiltetrahidrofurano (200 ml). Se combinan las capas orgánicas y se secan con sulfato de sodio anhidro. Se filtran, concentran y secan al vacío

durante la noche para proporcionar el compuesto del título (31,3 g; 70,4% de rendimiento) como un aceite amarillo. MS (m/z): 153 (M+1).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento de Preparación 3.

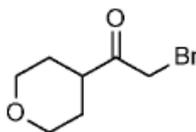
5

Tabla 2:

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos
4	2-(5-Amino-2-piridil)propan-2-ol		MS (m/z): 153 (M+1)

### Preparación 5

2-Bromo-1-tetrahidropiran-4-il-etanona



#### 10 Procedimiento 1:

Se añade cloruro de oxalilo (28,69 ml, 330,73 mmol) gota a gota a una mezcla de ácido tetrahidropiran-4-carboxílico (39,13 g, 300,67 mmol) en DCM (250 ml) y DMF (15 gotas). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 2,5 horas bajo nitrógeno. Se concentra bajo presión reducida y se disuelve el residuo en DCM (250 ml). Se añade la solución resultante gota a gota a (trimetilsilil)diazometano (2 M en hexanos, 450 ml, 900,00 mmol) a -10 °C y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se enfría la mezcla a 0 °C y se añade ácido bromhídrico (48 % p/p en agua, 52 ml, 462,73 mmol) gota a gota. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante dos horas. Se enfría la mezcla a 0 °C y se añade ácido bromhídrico (48 % p/p en agua, 26 ml, 231,36 mmol) gota a gota. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante dos horas. Se añade agua (250 ml), DCM (250 ml) y se aísla la capa orgánica. Se extrae la capa acuosa con DCM (2 x 250 ml). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (58,2 g; 93,48% de rendimiento) como un sólido marrón. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

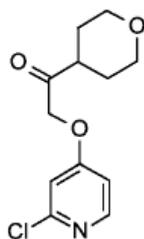
#### Procedimiento 2:

25 Se enfría una solución de 1-tetrahidropiran-4-iletanona (10 g, 78,02 mmol) en metanol (MeOH; 50 ml) a -10 °C. Se añade bromo (4,01 ml, 78,02 mmol) gota a gota. Se agita la mezcla a 0 °C durante 45 minutos y posteriormente a 10 °C durante 45 minutos. Se añade una solución acuosa de ácido sulfúrico (11 M, 27,5 ml, 302,50 mmol) y se agita la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Se añade agua y se extraer con dietil éter tres veces. Se combinan las capas orgánicas. Se lava con una solución acuosa de bicarbonato de sodio y agua. Se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (12 g; 74,28% de rendimiento) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

### Preparación 6

2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-tetrahidropiran-4-il-etanona

35

**Procedimiento 1:**

Se añade una solución de 2-bromo-1-tetrahidropiran-4-il-etanona (24,35 g, 117,60 mmol) en DMF (50 ml) gota a gota a una mezcla de agitación de 2-cloropiridin-4-ol (13,85 g, 106,91 mmol) y carbonato de cesio (69,67 g, 213,82 mmol) en DMF (380 ml) a temperatura ambiente. Se agita la mezcla resultante a 90 °C durante 2,5 horas. Se enfría a temperatura ambiente para proporcionar la mezcla bruta. Se combina con una mezcla bruta de otra reacción en escala de 2,85 g (2-cloropiridin-4-ol) corrida como se indicó anteriormente. Se diluye la mezcla combinada con agua (200 ml) y EtOAc (300 ml). Se aísla la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con EtOAc (3 x 250 ml). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con agua (100 ml) y solución acuosa de cloruro de sodio (100 ml). Se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (29,32 g; 88,96% de rendimiento) como un aceite marrón. MS (m/z): 256 (M+1).

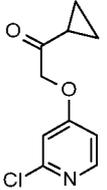
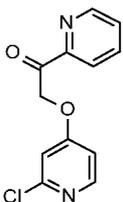
**Procedimiento 2:**

Se añade 2-bromo-1-tetrahidropiran-4-il-etanona (10,03 g, 48,42 mmol) y carbonato de potasio (10,14 g, 72,62 mmol) a una solución de 2-cloropiridin-4-ol (6,40 g, 48,42 mmol) en acetona (150 ml) y se agita la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Se filtra para eliminar el sólido y se lava el sólido con DCM. Se concentra el filtrado bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma cuantitativa MS (m/z): 256 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el **Procedimiento 2** de la Preparación 6.

**Tabla 3:**

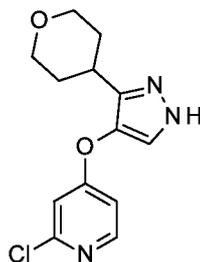
Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
7	1-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]butan-2-ona		200 (M+1)
8	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-tetrahidrofuran-3-il-etanona		242 (M+1)
9	1-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-3,3-dimetil-butan-2-ona		228 (M+1)
10	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-ciclobutil-etanona		226 (M+1)

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
11	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-ciclopropil-etanona		212 (M+1)
12	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-(2-piridil)etanona		249 (M+1)

### Preparación 13

2-Cloro-4-[(3-tetrahidropiran-4-il-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina

5



10

15

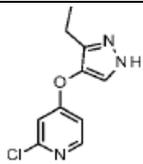
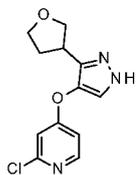
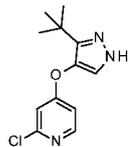
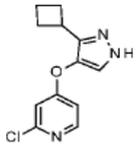
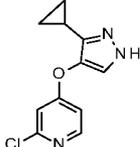
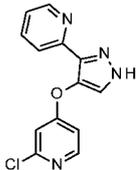
20

Se agita una mezcla de 2-[(2-cloro-4-piridil)oxi]-1-tetrahidropiran-4-il-etanona (29,3 g, 114,59 mmol) y 1,1-dimetoxi-N,N-dimetil-metanamina (65 ml, 486,83 mmol) a 100 °C durante dos horas. Se enfría a temperatura ambiente, se concentra bajo presión reducida y se disuelve el residuo en EtOAc (400 ml). Se lava con agua (100 ml) y solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml). Se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra bajo presión reducida para proporcionar un sólido marrón. Se disuelve en ácido acético (350 ml) y se enfría a 0 °C. Se añade monohidrato de hidracina (16,8 ml, 345,66 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante la noche bajo nitrógeno. Se vierte la mezcla en una mezcla hielo/agua (250 ml) y se extrae con EtOAc (4 x 200 ml). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con agua (200 ml), solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (100 ml) y solución acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml). Se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado bajo presión reducida para proporcionar un aceite marrón. Se purifica el aceite marrón mediante el uso del tapón de gel de sílice que eluye con EtOAc. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentra bajo presión reducida. Se seca al vacío para proporcionar el compuesto del título (24,43 g; 76,22% de rendimiento) como un sólido amarillo. MS (m/z): 280 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 13.

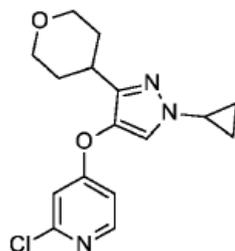
25

Tabla 4:

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
14	2-Cloro-4-[(3-etil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina		224 (M+1)
15	2-Cloro-4-[(3-tetrahidrofuran-3-il-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina		266 (M+1)
16	4-[(3-Terc-butil-1H-pirazol-4-il)oxi]-2-cloro-piridina		252 (M+1)
17	2-Cloro-4-[(3-ciclobutil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina		250 (M+1)
18	2-Cloro-4-[(3-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina		236 (M+1)
19	2-Cloro-4-[[3-(2-piridil)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridina		273 (M+1)

**Preparación 20**

2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina

**Procedimiento 1:**

Se somete a reflujo una mezcla de 2,2'-bipiridina (13,73 g, 87,90 mmol) y acetato de cobre(II) (15,97 g, 87,90 mmol) en 1,2-dicloroetano (244,3 ml) a 75 °C durante 25 minutos y posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Se añade una solución de 2-cloro-4-[(3-tetrahidropiran-4-il-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina (24,43 g, 79,91 mmol) en 1,2-dicloroetano (335,30 ml), posteriormente se añade ácido ciclopropilborónico (13,73 g, 159,82 mmol) y carbonato de sodio (16,94 g, 159,82 mmol). Se calienta la mezcla de reacción a 75 °C durante dos horas bajo una atmósfera de oxígeno y se enfría a temperatura ambiente. Se diluye con EtOAc (200 ml), se filtra a través de un tapón de gel de sílice y se lava con EtOAc (250 ml). Se lava el filtrado con agua (200 ml) y solución acuosa saturada de cloruro de sodio (200 ml). Se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado bajo presión reducida y se seca el residuo al vacío a temperatura ambiente durante la noche. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con 6-27% EtOAc en DCM para proporcionar el compuesto del título (20,75 g; 81,2% de rendimiento) como un sólido amarillo. MS (m/z): 320 (M+1).

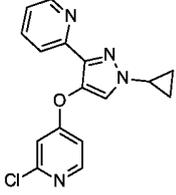
**Procedimiento 2:**

Se calienta una suspensión de 2,2'-bipiridina (28,8 g, 56,5 mmol) y acetato de cobre(II) (8,2 g, 45,2 mmol) en 1,2-dicloroetano (50 ml) a 70 °C y se purga con nitrógeno durante 3 minutos. Se filtra y se añade el filtrado a una mezcla de 2-cloro-4-[(3-tetrahidropiran-4-il-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina (8 g, 22,6 mmol), ciclopropil(trifluoro)borato de potasio (6,7 g, 45,2 mmol) y carbonato de sodio (4,8 g, 45,2 mmol) en 1,2-dicloroetano (50 ml). Se calienta la mezcla de reacción a 70 °C durante cuatro días. Se enfría a temperatura ambiente. Se filtra y se lava con DCM. Se lava el filtrado con solución acuosa saturada de cloruro de amonio y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado bajo presión reducida. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con 1-10% de MeOH en DCM para proporcionar el compuesto del título (6,0 g; 82,2% de rendimiento). MS (m/z): 320 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el **Procedimiento 1** de la Preparación 20. Se indica alteración en el procedimiento de desarrollo.

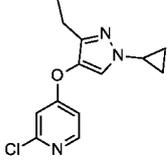
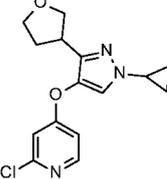
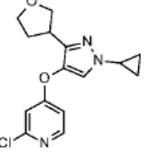
**Tabla 5:**

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	MS físico (m/z):	Comentarios
21	2-Cloro-4-(3-ciclobutil-1-ciclopropil-pirazol-4-il)oxi-piridina		290 (M+1)	
22	2-Cloro-4-(1,3-diciclopropilpirazol-4-il)oxi-piridina		276 (M+1)	

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	MS físico (m/z):	Comentarios
23	2-Cloro-4-[1-ciclopropil-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina		313 (M+1)	Usa hidróxido de amonio 23% en agua para inactivar la reacción.

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por **Procedimiento 2** de **Preparación 20**.

**Tabla 6:**

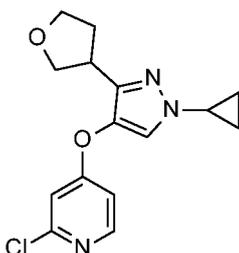
Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
24	2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-etil-pirazol-4-il)oxi-piridina		264 (M+1)
25	2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina		306 (M+1)
26	4-(3-Terc-butil-1-ciclopropil-pirazol-4-il)oxi-2-cloro-piridina		292 (M+1)

5

### Preparación 27

2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina, isómero 1

10



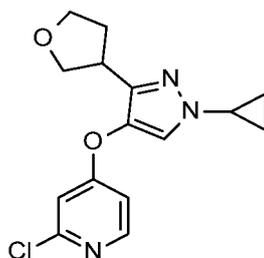
Se purifica la mezcla racémica de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (Preparación

25) con cromatografía quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente como el compuesto del título. MS (m/z): 306 (M+1).

Condiciones de purificación: CHIRALPAK® IC; Fase móvil: 20% EtOH en dióxido de carbono; Caudal: 300 g/minuto; UVW: 240 nm; Tiempo de retención: 2,44 minutos.

#### 5 Preparación 28

2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina, isómero 2



10

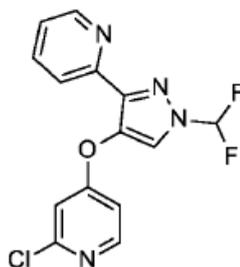
Se purifica la mezcla racémica de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (Preparación 25) con cromatografía quiral para proporcionar el segundo enantiómero eluyente como el compuesto del título. MS (m/z): 306 (M+1).

15

Condiciones de purificación: CHIRALPAK® IC; Fase móvil: 20% EtOH en dióxido de carbono; Caudal: 300 g/minuto; UVW: 240 nm; Tiempo de retención: 2,93 minutos.

#### Preparación 29

2-Cloro-4-[1-(difluorometil)-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina



20

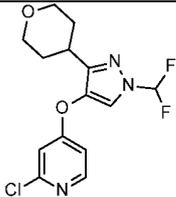
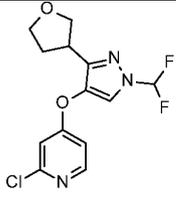
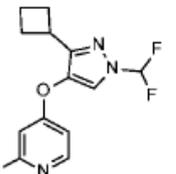
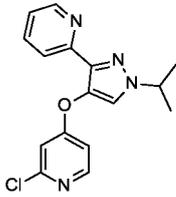
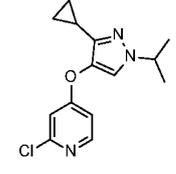
Se enfría una solución de 2-cloro-4-[[3-(2-piridil)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridina (2,0 g, 7,33 mmol) en DMF (73,34 ml) en un baño de hielo y se añade hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 880,02 mg, 22,00 mmol) en porciones. Se agita la mezcla a 0 °C durante 10 minutos, se deja calentar a temperatura ambiente y se agita durante 10 minutos. Se añade difluoroyodometano (10% en peso en THF, 27,19 ml, 36,67 mmol) y se agita la mezcla de reacción a 45 °C durante la noche. Se enfría a temperatura ambiente y se diluye con EtOAc. Se lava primero con solución acuosa de cloruro de litio 5% y posteriormente se lava con solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado bajo presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice con 0-50% de EtOAc en DCM. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentra bajo presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice con 0-10% de EtOAc en DCM para proporcionar el compuesto del título (,56 g; 65,9% de rendimiento). MS (m/z): 323 (M+1).

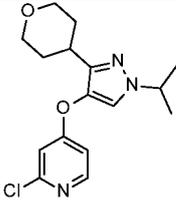
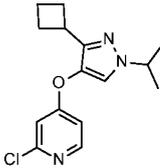
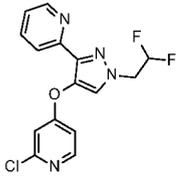
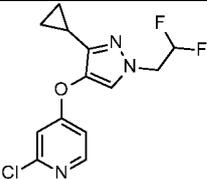
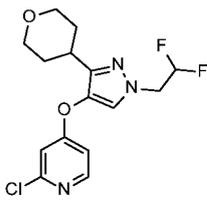
25

30

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 29. Se indican las alteraciones en el disolvente, base, y/o temperatura de reacción.

Tabla 7:

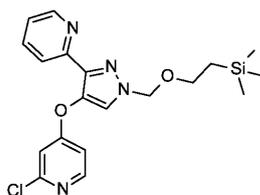
Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos	Comentarios
30	2-Cloro-4-[3-ciclopropil-1-(difluorometil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 286 (M+1)	THF, terc-butóxido de potasio,
31	2-Cloro-4-[1-difluorometil)-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il]oxi-piridina		$^1\text{H}$ RMN (399,83 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) $\delta$ 8,42 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Hz, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Hz, 1H), 7,15 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,04 (dd, J=2,4 Hz, J=5,6 Hz, 1H), 3,81 (m, 2H), 3,33(m, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,64 (m, 4H).	
32	2-Cloro-4-[1-(difluorometil)-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il]oxi-piridina		$^1\text{H}$ RMN (399,83 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) $\delta$ 8,46 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Hz, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Hz, 1H), 7,16 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,05 (dd, J=2,4 Hz, J=5,6 Hz, 1H), 3,89 (t, J= 6,0 Hz, 1H), 3,68 (m, 3H), 3,26 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,99 (m, 1H).	
33	2-Cloro-4-[3-ciclobutil-1-(difluorometil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 300 (M+1)	
34	2-Cloro-4-[1-isopropil-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 315 (M+1)	THF, terc-butóxido de potasio, reflujo durante la noche
35	2-Cloro-4-(3-ciclopropil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-piridina		MS (m/z): 278 (M+1)	temperatura ambiente
	2-Cloro-4-(1-isopropil-3-tetrahidropiran-4-il-			temperatura

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos	Comentarios
36	pirazol-4-il)oxi-piridina		MS (m/z): 322 (M+1)	ambiente
37	2-Cloro-4-(3-ciclobutil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-piridina		MS (m/z): 292 (M+1)	temperatura ambiente
38	2-Cloro-4-[1-(2,2-difluoroetil)-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 337 (M+1)	THF, terc-butóxido de potasio, 50°C
39	2-Cloro-4-[3-ciclopropil-1-(2,2-difluoroetil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 300 (M+1)	Carbonato de cesio, 50°C
40	2-Cloro-4-[1-(2,2-difluoroetil)-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 344 (M+1)	Carbonato de cesio, 50°C

### Preparación 41

2-Cloro-4-[[3-(piridin-2-il)-1-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-1H-pirazol-4-il]oxi]piridina

5



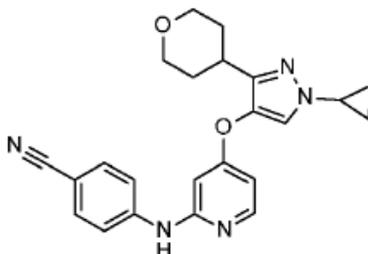
10

Se añade hidruro de sodio (60% de suspensión en aceite mineral, 484 mg, 12,10 mmol) a una solución de 2-cloro-4-[[3-(2-piridil)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridina (3,0 g, 11,00 mmol) en THF (110 ml) a 0 °C. Se agita durante 15 minutos a 0 °C y se añade cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetilo (2,02 g, 12,10 mmol). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentra la mezcla. Se divide el residuo entre DCM y agua. Se aísla la capa orgánica y se seca con sulfato de sodio. Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado bajo presión reducida. Se

purifica el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice con 0-30% de EtOAc en hexano para proporcionar el compuesto del título (3,64 g; 82,1% de rendimiento). MS (m/z): 403 (M+1).

#### Preparación 42

4-[[4-(1-Ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo



5

10

Se purga una solución de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (400 mg, 1,2 mmol), p-aminobenzonitrilo (219,9 mg, 1,9 mmol), carbonato de cesio (568,5 mg, 1,7 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (134,6 mg, 0,23 mmol) en 1,4-dioxano (15 ml) con nitrógeno durante cinco minutos. Se trata la mezcla resultante con acetato de paladio(II) (26,1 mg, 0,12 mmol) y se purga con nitrógeno durante 5 minutos. Se cierra el vial y se agita a 100 °C durante dos horas posteriormente 80 °C durante el fin de semana. Se enfría a temperatura ambiente, se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con 5% MeOH en DCM. Se concentra el filtrado para proporcionar el compuesto del título (467 mg; 100% de rendimiento). MS (m/z): 402 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento de Preparación 42. Se indican las alteraciones en catalizador, y/o disolvente.

15

Tabla 8:

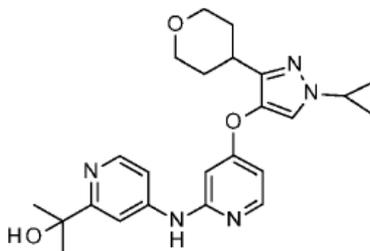
Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
43	2-[5-[[4-[3-(2-Piridil)-1-(2-trimetilsililetoximetil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]-2-piridil] propan-2-ol		519 (M+1)	Tris(dibencilide nacetona) dipaladio(0), tolueno
44	4-[[4-(3-ciclopropil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-2-piridil] amino]piridina-2-carboxilato de metilo		394 (M+1)	Tris(dibencilide nacetona) dipaladio(0), tolueno
45	4-[[4-[1-Isopropil-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino] benzonitrilo		397 (M+1)	
	3-[[4-(1-Ciclopropil-3			

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
46	-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il) oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		402 (M+1)	
47	4-[[4-(1-Ciclopropil-3-etil-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		346 (M+1)	
48	4-[[4-[1-(Difluorometil)-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		412 (M+1)	
49	N-[4-[1-(Difluorometil)-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il]oxi-2-piridil]piridazin-3-amina		375 (M+1)	Tris(dibencilide nacetona) dipaladio(0)
50	2-[4-[[4-(1-Ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]-2-piridil]propan-2-ol		422 (M+1)	
51	4-[[4-[3-Ciclobutil-1-(difluorometil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		382 (M+1)	
52	3-[[4-[1-(Difluorometil)-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		405 (M+1)	

Prep. Núm.	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
53	4-[[4-(1,3-Diciclopropilpirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		358 (M+1)	

**Ejemplo 1**

2-{4-[(4-[[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol

**5 Procedimiento 1:**

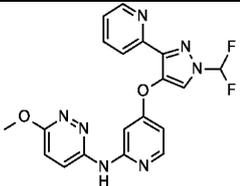
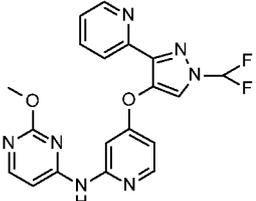
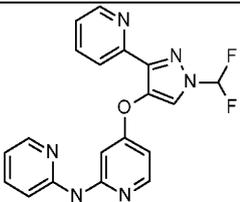
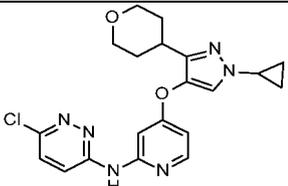
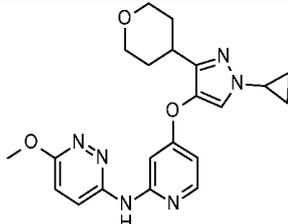
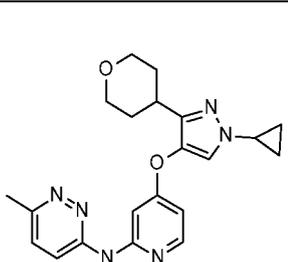
Se purga una solución de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (45,6 g, 142,6 mmol), 2-(4-amino-2-piridil)propan-2-ol (26,0 g, 171,1 mmol) y fenato de sodio (26,5 g, 228,2 mmol) en 1,4-dioxano (456 ml) con nitrógeno for 20 minutos. Se trata la mezcla resultante con 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (8,25 g, 14,3 mmol) y bis(dibencilidenacetona)paladio (4,10 g, 7,13 mmol). Se somete a reflujo durante 21 horas. Se enfría la reacción a temperatura ambiente y se agita durante la noche. Se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con DCM (500 ml). Se concentra el filtrado sobre gel de sílice. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con 0-10% de MeOH en EtOAc. Se concentran las fracciones apropiadas y se secan al vacío durante la noche para proporcionar el compuesto del título (58,7 g; 91,7% de rendimiento). MS (m/z): 436 (M+1). Se producen varios lotes del producto usando el anterior procedimiento. Se disuelven los lotes combinados de los compuestos del título (92,4 g) en EtOH (1 L). Se trata la solución con QUADRASIL® MP (100 g, 1,0-1,5 mmol/g) y se agita a 60 °C durante una hora. Se enfría a temperatura ambiente y se filtra para eliminar los sólidos. Se concentra para eliminar el disolvente. Se disuelve el residuo en EtOH (500 ml) mientras que se calienta a 100 °C. Posteriormente se enfría la mezcla lentamente a temperatura ambiente y se añade agua (500 ml) lentamente. Se enfría la mezcla a 5 °C mientras se agita. Se recolecta el sólido por filtración y se seca al vacío a 45 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título (81,8 g). MS (m/z): 436 (M+1).

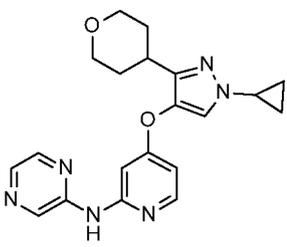
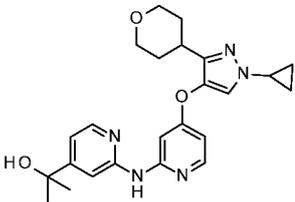
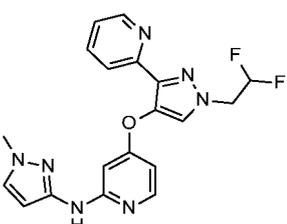
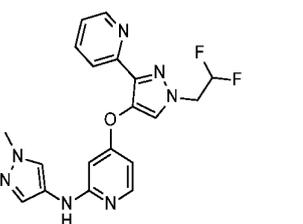
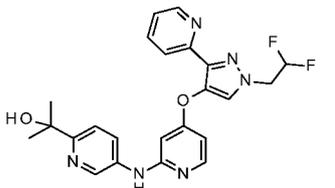
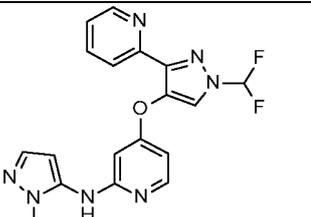
**Procedimiento 2:**

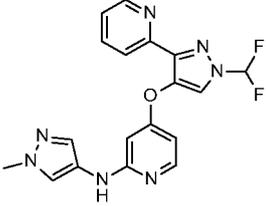
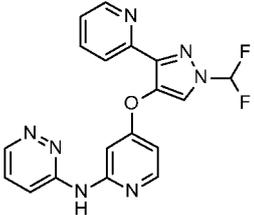
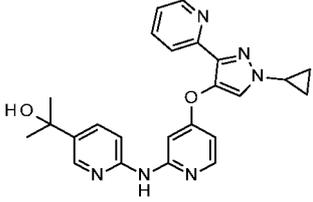
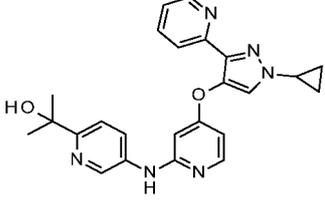
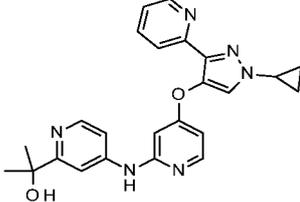
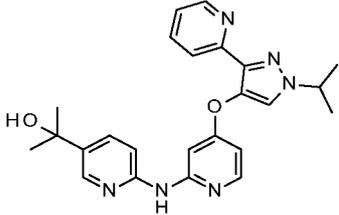
Se disuelve 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxipiridina (400 mg, 1,2 mmol) en 1,4-dioxano (15 ml) en un vial. Se añade 2-(4-amino-2-piridil)propan-2-ol (266,5 mg, 1,6 mmol), carbonato de cesio (568,5 mg, 1,7 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (134,6 mg, 0,23 mmol) y se purga con nitrógeno durante 5 minutos. Se añade acetato de paladio(II) (26,1 mg, 0,12 mmol) y se purga con nitrógeno durante 5 minutos. Se sella el vial y se agita a 100 °C durante la noche. Se enfría la reacción a temperatura ambiente, se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con 5% de MeOH en DCM. Se concentra y purifica por cromatografía de fase inversa (Columna de fase inversa de C18 de alto rendimiento Redisep Rf Gold, 0-100% de ácido fórmico/acetónitrilo (ACN) en ácido fórmico/agua). Se concentran las fracciones apropiadas y se secan al vacío para proporcionar el compuesto del título (341 mg; 67,3% de rendimiento). MS (m/z): 436 (M+1).

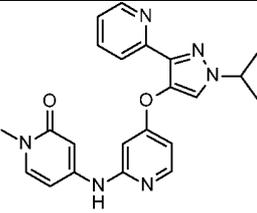
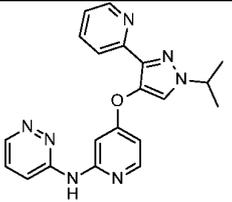
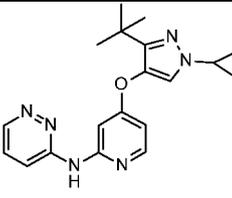
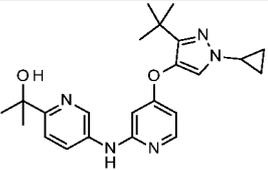
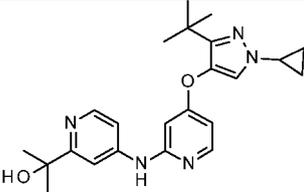
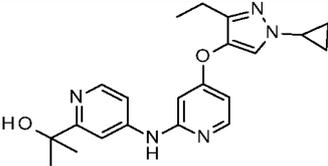
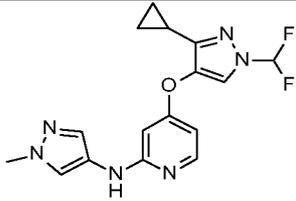
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el **Procedimiento 2** del **Ejemplo 1**. Se indican las alteraciones en base, catalizador, ligando y/o disolvente.

Tabla 9

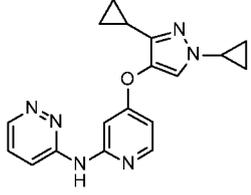
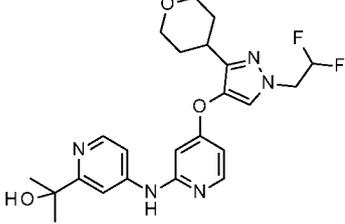
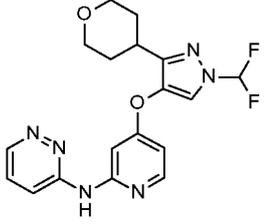
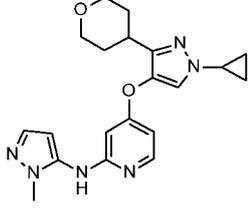
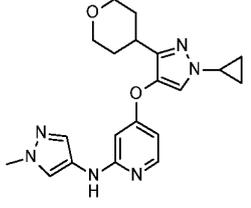
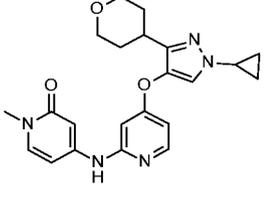
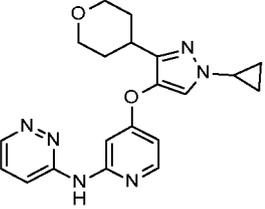
Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
2	N-(4-{{1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxilpiridin-2-il)-6-metoxipiridazin-3-amina		412 (M+1)	bis (dibencilidenacetona) paladio
3	N-(4-{{1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)-2-metoxipirimidin-4-amina		412 (M+1)	bis (dibencilidenacetona) paladio
4	4-{{1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}-N-(piridin-2-il)piridin-2-amina		381 (M+1)	
5	6-Cloro-N-(4-{{1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina		413 (M+1)	
6	N-(4-{{1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)-6-metoxipiridazin-3-amina		409 (M+1)	
7	N-(4-{{1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)-6-metilpiridazin-3-amina		393 (M+1)	

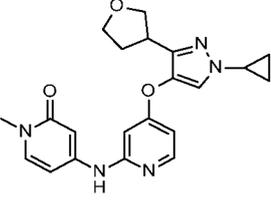
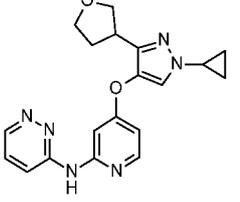
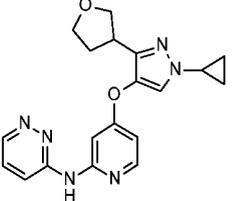
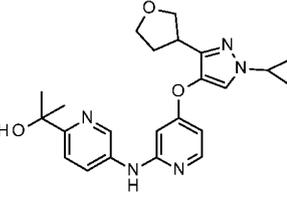
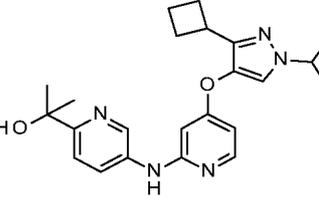
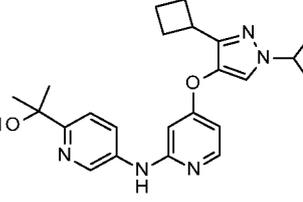
Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
8	N-(4-{{1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)pirazin-2-amina		379 (M+1)	
9	2-{2-[(4-{{1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)amino]piridin-4-il} propan-2-ol		436 (M+1)	
10	4-{{1-(2,2-Difluoroetil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-3-il)piridin-2-amina		398 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
11	4-{{1-(2,2-Difluoroetil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		398 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
12	2-{5-[(4-{{1-(2,2-Difluoroetil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi} piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		453 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
13	4-{{1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-amina		384 (M+1)	bis (dibencilidenacetona) paladio

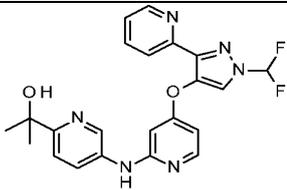
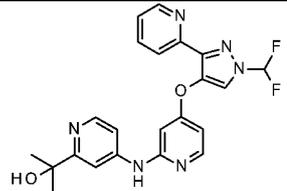
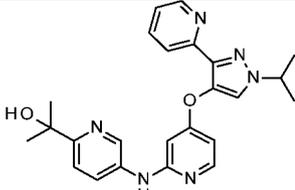
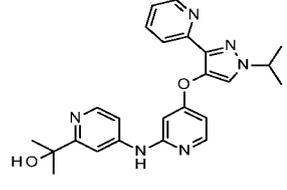
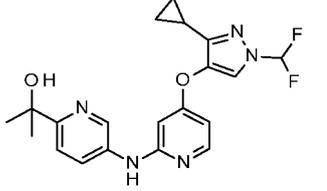
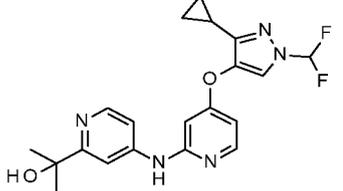
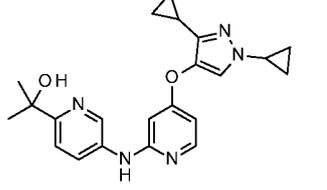
Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
14	4-[[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		384 (M+1)	bis (dibencilidenacetona) paladio
15	N-(4-[[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il) piridazin-3-amina		382 (M+1)	bis (dibencilidenacetona) paladio
16	2-{6-[[4-[[1-Ciclopropil-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il]amino]piridin-3-il}propan-2-ol		429 (M+1)	
17	2-{5-[[4-[[1-Ciclopropil-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il]amino]piridin-2-il}propan-2-ol		429 (M+1)	
18	2-{4-[[4-[[1-Ciclopropil-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il]amino]piridin-2-il}propan-2-ol		429 (M+1)	
19	2-{6-[[4-[[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il]amino]piridin-3-il}propan-2-ol		431 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
20	1-Metil-4-[(4-{[1-(propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il) amino]piridin-2(1H)-ona		403 (M+1)	
21	N-(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il) piridazin-3-amina		374 (M+1)	
22	N-{4-[(3-Terc-butil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}piridazin-3-amina		351 (M+1)	
23	2-[5-({4-[(3-Terc-butil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-2-il]propan-2-ol		408 (M+1)	
24	2-[4-({4-[(3-Terc-butil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-2-il]propan-2-ol		408 (M+1)	
25	2-[4-({4-[(1-Ciclopropil-3-etil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-2-il]propan-2-ol		380 (M+1)	
26	4-{[3-Ciclopropil-1-difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		347 (M+1)	bis(dibencilidenacetona) paladio

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
27	2-{4-[(4-{[3-Ciclopropil-1-(2,2-difluoroetil)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		416 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
28	N-(4-{[3-Ciclopropil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina		345 (M+1)	bis(dibencilidenacetona) paladio
29	4-((4-{[1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino)-1-metilpirimidin-2(1H)-ona		365 (M+1)	
30	4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]-N-(1-metil-1H-pirazol-3-il)piridin-2-amina		337 (M+1)	
31	2-[6-((4-{[1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino)piridin-3-il]propan-2-ol		392 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
32	4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		337 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
33	4-((4-{[1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino)-1-metilpiridin-2(1H)-ona		364 (M+1)	bis (dibencilidenacetona) paladio, tolueno/N-metilpirrolidone

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
34	N-{4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}piridazin-3-amina		335 (M+1)	
35	2-{4-[(4-{[1-(2,2-Difluoroetil)-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		460 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
36	N-(4-{[1-(Difluorometil)-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-il]oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina		389 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio
37	4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-amina		381 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio
38	4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		381 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio
39	4-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]-1-metilpiridin-2(1H)-ona		408 (M+1)	
40	N-(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina		379 (M+1)	

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
41	4-[(4-[[1-Ciclopropil-3-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]-1-metilpiridin-2(1H)-ona		394 (M+1)	
42	N-[4-((1-Ciclopropil-3-(tetrahydrofuran-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il)piridazin-3-amina, isómero 2		365 (M+1)	
43	N-[4-((1-Ciclopropil-3-(tetrahydrofuran-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il)piridazin-3-amina, isómero 1		365 (M+1)	
44	2-[5-[(4-[[1-Ciclopropil-3-(tetrahydrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il]propan-2-ol		422 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
45	2-[5-[(4-[[3-Ciclobutil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il]propan-2-ol		416 (M+1)	
46	2-[5-[(4-[[3-Ciclobutil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il]propan-2-ol		406 (M+1)	

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
47	2-{5-[(4-{[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		439 (M+1)	
48	2-{4-[(4-{[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		439 (M+1)	
49	2-{5-[(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		431 (M+1)	
50	2-{4-[(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		431 (M+1)	
51	2-{5-[(4-{[3-Ciclopropil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		402 (M+1)	
52	2-{4-[(4-{[3-Ciclopropil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		402 (M+1)	
53	2-[5-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il]propan-2-ol		392 (M+1)	

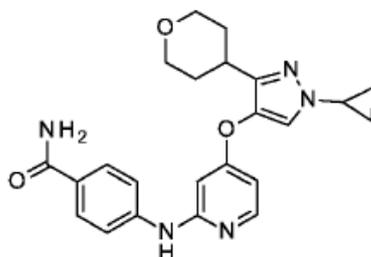
ES 2 700 376 T3

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
54	2-[4-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il)amino}piridin-2-il]propan-2-ol		392 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
55	2-{5-[4-{{3-Ciclopropil-1-(propan-2-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		394 (M+1)	fenato de sodio, bis (dibencilidenacetona) paladio
56	2-{5-[4-{{1-(Difluorometil)-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		446 (M+1)	
57	2-{4-[4-{{1-(Difluorometil)-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		446 (M+1)	
58	2-{5-[4-{{1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		436 (M+1)	
59	2-{4-[4-{{1-(Propan-2-il)-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il}oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		438 (M+1)	
60	2-[4-({4-[(3-Ciclobutil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il)amino}piridin-2-il]propan-2-ol		406 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
61	2-{4-[(4-{[3-Ciclobutil-1-(propan-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		408 (M+1)	

**Ejemplo 62**

4-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il) amino]benzamida



- 5 Se añade carbonato de potasio (80,4 mg, 0,58 mmol) a una solución de 4-[(4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo (467 mg, 1,16 mmol) en DMSO (5 ml). Se añade peróxido de hidrógeno 30% (1,77 ml, 17,45 mmol) y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se diluye con agua y se extrae con DCM cuatro veces. Se combinan las capas orgánicas y se lavan con solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Se seca con sulfato de sodio anhidro. Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado bajo presión reducida. Se purifica el residuo por cromatografía de fase inversa (Columna de fase inversa C18 de alto rendimiento Redisep Rf Gold, 0-100% de ácido fórmico/ACN en ácido fórmico/agua) para proporcionar el compuesto del título (220 mg; 45,9% de rendimiento). MS (m/z): 420 (M+1).
- 10

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente por el procedimiento del Ejemplo 62.

15

**Tabla 10**

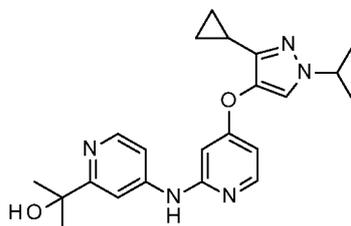
Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
63	3-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]benzamida		420 (M+1)
64	3-[(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]benzamida		415 (M+1)

Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
65	4-({4-[(1-Ciclopropil-3-etil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)benzamida		364 (M+1)
66	4-[(4-[[1-(Difluorometil)-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]benzamida		430 (M+1)
67	4-[(4-[[3-Ciclobutil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]benzamida		400 (M+1)
68	3-[(4-[[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]benzamida		423 (M+1)
69	4-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)benzamida		376 (M+1)

**Ejemplo 70**

2-{4-[(4-[[3-Ciclopropil-1-(propan-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol

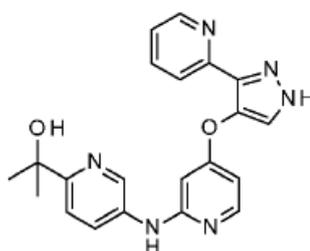
5



Se purga una solución de 4-[[4-(3-ciclopropil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]piridina-2-carboxilato de metilo (298 mg, 0,76 mmol) en THF (6 ml) en un vial sellado con nitrógeno. Se añade bromuro de metilmagnesio (3 M en dietil éter, 1,01 ml, 3,03 mmol) gota a gota y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante dos horas. Se concentra la mezcla bajo presión reducida y se diluye el residuo con DCM y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se aísla la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con DCM. Se combinan las capas orgánicas y se lavan con solución acuosa saturada de cloruro de sodio. Se seca con sulfato de sodio, se filtra y se concentra el filtrado. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice con 5-10% MeOH en DCM para proporcionar el compuesto del título (160 mg; 53,69% de rendimiento). MS (m/z): 394 (M+1).

#### 10 Ejemplo 71

2-{5-[[4-[[3-(Piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il]amino]piridin-2-il}propan-2-ol

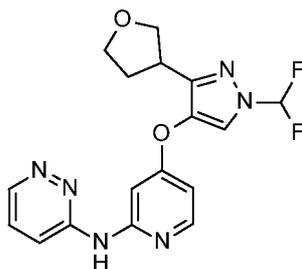


Se enfría una solución de 2-[5-[[4-[[3-(2-Piridil)-1-(2-trimetilsililetoximetil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]-2-piridil]propan-2-ol (500 mg, 0,96 mmol) en ácido trifluoroacético (3 ml) a 0 °C en un baño de hielo. Se añade trietilsilano (1 ml, 6,24 mmol). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentra y se purifica el residuo por cromatografía de fase inversa (Columna de fase inversa C18 de alto rendimiento Redisep Rf Gold, 0-100% de bicarbonato de amonio 10 mM en ACN). Se concentra las fracciones apropiadas para eliminar ACN. Se extrae la mezcla acuosa resultante con DCM, se aísla la capa orgánica, y se seca con sulfato de sodio. Se filtra y se concentra el filtrado bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (168 mg; 44,9% de rendimiento). MS (m/z): 389 (M+1).

#### Ejemplo 72

N-[4-((1-(Difluorometil)-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il]piridazin-3-amina, isómero 1

25



30 Se purifica la mezcla racémica de N-[4-[[1-(difluorometil)-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il]oxi-2-piridil]piridazin-3-amina (Preparación 49) con cromatografía quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente como el compuesto del título. MS (m/z): 375 (M+1).

Condiciones de purificación: CHIRALPAK® IC; Fase móvil: 30% de isopropanol que contiene 0,2% de isopropil amina en dióxido de carbono; Caudal: 70 g/minute; UVW: 280 nm; Tiempo de retención: 3,93 minutos.

35 El siguiente compuesto se prepara esencialmente por el procedimiento del **Ejemplo 72**. Se indican las condiciones de purificación alternadas.

Tabla 11:

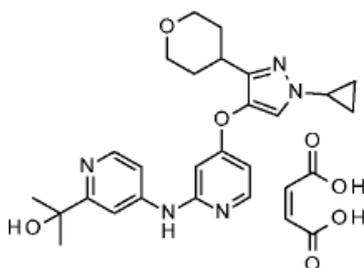
Ej. Núm	Nombre químico	Estructura	Condiciones	Datos físicos
73	2-(5-[[4-((1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il]amino]piridin-2-il)propan-2-ol, isómero 1		CHIRALCEL® OJ-H; Fase móvil: 20% EtOH en heptano; Caudal: 425 ml/minutos; UVW: 280 nm; Tiempo de retención: 17,39 minutos	MS (m/z): 422 (M+1)
74	2-(5-[[4-((1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il]amino]piridin-2-il)propan-2-ol, isómero 2		CHIRALCEL® OJ-H; Fase móvil: 20% EtOH en heptano; Caudal: 425 ml/minutos; UVW: 280 nm; Tiempo de retención: 21,55 minutos	MS (m/z): 422 (M+1)
75	2-(4-[[4-((1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il]amino]piridin-2-il)propan-2-ol, isómero 1		CHIRALCEL® OJ-H; Fase móvil: 20% isopropanol que contiene 0,2% isopropil amina en dióxido de carbono; Caudal: 70 g/minute; UVW: 225 nm; Tiempo de retención: 2,67 minutos	MS (m/z): 422 (M+1)
76	2-(4-[[4-((1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il)oxi)piridin-2-il]amino]piridin-2-il)propan-2-ol, isómero 2		CHIRALCEL® OJ-H; Fase móvil: 20% isopropanol que contiene 0,2% isopropil amina en dióxido de carbono; Caudal: 70 g/minute; UVW: 225 nm; Tiempo de retención: 3,59 minutos	MS (m/z): 422 (M+1)

**Procedimiento de recolección de difracción de rayos X de polvo para los Ejemplos 77-79**

- 5 Se obtiene los patrones XRD de sólidos cristalinos en un difractómetro de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente de CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ ) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. Se escanea la muestra entre 4 y 40 ° en  $2\theta$ , con un tamaño de paso de 0,009 ° en  $2\theta$  y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/paso, y con divergencia de 0,6 mm, anti-dispersión fija de 5,28 y ranuras del detector de 9,5 mm. Se empaqueta el polvo seco en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa con un portaobjetos de vidrio. Se recolecta los patrones de difracción de forma cristalina a temperatura ambiente y humedad relativa.
- 10

**Ejemplo 77**

2-{4-[[4-[[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il]amino]piridin-2-il}propan-2-ol, (2Z)-but-2-enedioato (1:1)



5 Se añade 2-{4-[(4-[[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol (142 mg) en ACN (2 ml). El sólido se disuelve completamente mientras que se agita a 80 °C/1000 rpm. Se añade ácido maleico (48 mg, 1,20 equivalentes, en 1 ml de ACN a 80 °C) a la solución resultante. La mezcla está turbia inicialmente pero se vuelve rápidamente una solución transparente. Se detiene el calentamiento y agitación. Se enfría la solución a temperatura ambiente. Se añaden otros 2 ml de ACN para suspender el sólido. Se aísla el sólido blanco por filtración al vacío y se seca el sólido en su lugar sobre el filtro durante 15 minutos bajo una corriente de aire. Se seca el sólido resultante en un horno de vacío 65 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título (132 mg, 73,4% de rendimiento). El porcentaje teórico de ión ácido maleico en la sal formada para una sal mono es 21,0%. El análisis de contraiones por HPLC determina que el porcentaje real de ión ácido maleico en la sal formada es del 17,2%. El análisis de contraiones indica una sal monoácida.

#### Difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 77

15 Una muestra preparada del **Ejemplo 77** se caracteriza por un patrón XRD que utiliza radiación CuKa con picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la siguiente Tabla 13, y en particular que tienen picos en 9,6° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 12,5°, 17,5°, y 16,9°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

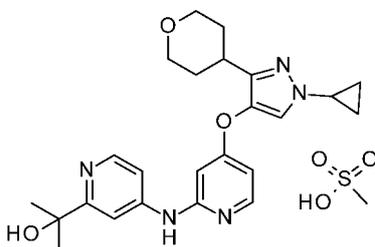
**Tabla 12: Picos de Difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 77**

Pico	Ángulo (°2-Theta) +/-0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	9,6	100,0
2	12,5	88,2
3	17,5	74,4
4	16,9	55,8
5	12,9	54,0
6	20,1	45,9
7	21,5	44,1
8	19,2	36,4
9	20,9	35,5
10	23,5	32,0

#### **Ejemplo 78**

20 2-{4-[(4-[[1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol, metansulfonato (1:1)

25



Se añade 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol (113 mg) en acetona (2 ml). El sólido se disuelve completamente mientras que se agita a 60 °C/1000 rpm. Se añade ácido metansulfónico (21 ml, 1,24 equivalentes) a la solución resultante. Se detiene el calentamiento y la agitación. Se enfría la solución a temperatura ambiente. Se añaden otros 3 ml de acetona para suspender el sólido. Se aísla el sólido blanco por filtración al vacío y se seca el sólido en su lugar en el filtro durante 15 minutos bajo una corriente de aire. Se seca el sólido resultante en un horno de vacío a 65 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título (87 mg, 63,08% de rendimiento). El porcentaje teórico de ión ácido metansulfónico en la sal formada para una sal mono es 18,1%. El análisis de contraiones por HPLC determina que el porcentaje real de ión ácido metansulfónico en la sal formada es del 16,2%. El análisis de contraiones indica una sal monoácida.

#### Difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 78

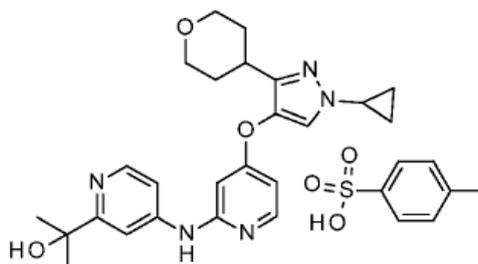
Una muestra preparada del **Ejemplo 78** se caracteriza por un patrón XRD que utiliza radiación CuK $\alpha$  con picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la siguiente Tabla 14, y en particular que tienen picos en 7,0° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consisten en 14,1°, 10,8°, y 18,6°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 13: Difracción de rayos X de polvo picos del Ejemplo 78

Pico	Ángulo (°2-Theta) +/-0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	7,0	100,0
2	14,1	93,2
3	10,8	73,6
4	18,6	66,1
5	15,9	61,4
6	19,7	60,7
7	5,4	49,2
8	7,9	49,1
9	4,5	48,1
10	17,8	47,6

#### Ejemplo 79

4-Metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol (1:1)



Se añade 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol (122 mg) en EtOAc (2 ml). Se disuelve el sólido completamente mientras se agita a 80 °C/1000 rpm. Se añade monohidrato del ácido p-toluensulfónico (1,23 equivalente, en 1 ml de EtOAc a 80 °C) a la solución resultante. Se suspende la mezcla a 80°C/1000 rpm durante 30 minutos. Se apaga el calor y se mantiene la agitación de la mezcla a 1000 rpm a medida que se enfría a temperatura ambiente. Se aísla el sólido blanco resultante por filtración al vacío y se seca el sólido en su lugar sobre el filtro durante 15 minutos bajo una corriente de aire. Se seca el sólido resultante en un horno de vacío a 65 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título

(159 mg, 93,40% de rendimiento). El porcentaje teórico de ión ácido p-toluensulfónico en la sal formada para una sal mono es del 29,3%. El análisis de contraiones por HPLC determina que el porcentaje real de ión ácido p-toluensulfónico en la sal formada es del 28,3%. El análisis de contraiones indica una sal mono.

#### **Difracción de rayos X de polvo del Ejemplo 79**

- 5 Una muestra preparada del **Ejemplo 79** se caracteriza por un patrón de DRX que usa radiación CuK $\alpha$  que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la siguiente Tabla 15, y en particular que tienen picos en 17,8° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 19,7°, 18,4°, y 22,0°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

**Tabla 14: Difracción de rayos X de polvo picos del Ejemplo 79**

Pico	Ángulo (°2-Theta) +/-0,2°	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	17,8	100,0
2	19,7	78,0
3	18,4	65,8
4	22,0	53,0
5	20,3	50,5
6	10,1	48,0
7	16,4	46,5
8	11,5	24,6
9	7,4	14,2
10	7,8	13,1

10

La señalización a través de la vía del TGF $\beta$  se ha asociado con el cáncer y la progresión tumoral en varias indicaciones ((Elliott et. al. (2005) J Clin Oncol 23:2078; Levy et. al. (2006) Cytokine & Growth Factor Rev 17:41-58). Hay varios tipos de cáncer en los que los ligandos de TGF $\beta$  producidos por el tumor o por el estroma en el microambiente del tumor pueden participar en la progresión del tumor. Las células de cáncer de próstata de rata MATLyLu (Steiner and Barrack (1992) Mol. Endocrinol 6: 15-25) y las células de cáncer de mama humano MCF-7 (Arteaga, et al. (1993) Cell Growth and Differ. 4: 193-201) se convirtieron en más tumorigénicas y metastásicas después de la transfección con un vector que expresa el TGF $\beta$ 1 de ratón. El TGF $\beta$ 1 se ha asociado con angiogénesis, metástasis y mal pronóstico en próstata humana y cáncer gástrico avanzado (Wikstrom, P., et al. (1998) Prostate 37: 19-29; Saito, H. et al. (1999) Cancer 86: 1455-1462). En el cáncer de mama, el mal pronóstico se asocia con un aumento de TGF- $\beta$  (Dickson, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:837-841; Kasid, et al. (1987) Cancer Res,47:5733-5738; Daly, et al. (1990) J. Cell Biochem. 43:199-211; Barrett-Lee, et al. (1990) Br. J Cancer 61:612-617; King, et al. (1989) J. Steroid Biochem. 34:133-138; Welch, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7678-7682; Walker, et al. (1992) Eur. J. Cancer 28:641-644) y la inducción de TGF- $\beta$ 1 por el tratamiento con tamoxifeno (Butta, et al. (1992) Cancer Res. 52: 4261-4264) se ha asociado con el fracaso del tratamiento con tamoxifeno para el cáncer de mama (Thompson, et al. (1991) Br. J. Cancer 63: 609-614). Los anticuerpos anti-TGF $\beta$ 1 inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama humano MDA-231 en ratones atímicos (Arteaga, et al. (1993) J. Clin. Invest. 92: 2569-2576), un tratamiento que se correlaciona con un aumento en la actividad de las células citolíticas naturales del bazo. Las células CHO transfectadas con TGF $\beta$ 1 latente también mostraron una actividad NK disminuida y un aumento del crecimiento tumoral en ratones desnudos (Wallick, et al. (1990) J. Exp. Med. 172: 1777-1784). Por lo tanto, el TGF- $\beta$  secretado por tumores de mama puede causar una supresión inmunitaria endocrina. Se ha demostrado que las altas concentraciones plasmáticas de TGF- $\beta$ 1 indican un mal pronóstico para los pacientes con cáncer de mama avanzado (Anscher, et al. (1993) N. Engl. J. Med. 328: 1592-1598). Los pacientes con TGF- $\beta$  de alta circulación antes de la quimioterapia de dosis alta y el trasplante autólogo de médula ósea tienen un alto riesgo de enfermedad venooclusiva hepática (15-50% de todos los pacientes con una tasa de mortalidad de hasta 50%) y pneumonitis intersticial idiopática (40-60% de todos los pacientes). La implicación de estos hallazgos es 1) que los niveles plasmáticos elevados de TGF- $\beta$  se pueden usar para identificar a los pacientes en riesgo y 2) que la reducción de la señalización de TGF- $\beta$  puede disminuir la morbilidad y mortalidad de estos tratamientos comunes para pacientes con cáncer de mama.

35

Publicaciones recientes también han sugerido que la señalización de TGF- $\beta$  puede ser importante para impulsar la

resistencia de los tumores a tratamientos de referencia, incluidas las quimioterapias y los receptores de tirosina quinasa (documento WO2012138783). Específicamente, en el cáncer de colon, se ha demostrado que un motivo distintivo de expresión génica aísla a un grupo de pacientes que son resistentes a los tratamientos comunes de primera línea. Estas células tumorales recuperan la sensibilidad al tratamiento cuando la vía de TGF $\beta$  se bloquea con un inhibidor de molécula pequeña específico de TGF $\beta$ RI (Huang, et. al. (2012) *Cell* 151:937-950; Sadanyam et al. (2013) *Nat Med* 19:619-625; Vermeulen et. al. (2013) *Nat Med* 19:614-618; Roepman et. al. (2014) 134:552-562).

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos del sistema hematopoyético en el compartimiento mieloide y se caracterizan por una producción ineficaz de células mieloides. MDS está ligado a alteraciones de la vía TGF $\beta$  representadas por niveles reducidos de SMAD7. SMAD7 es un inhibidor de SMAD que funciona para inhibir la señalización SMAD mediada por TGF $\beta$  y está corriente abajo de la señalización activada por ligando a través de TGF $\beta$ RI y TGF $\beta$ RII. Por lo tanto, se considera que la sobreexpresión de SMAD7 conduce a una sobreactivación de la señalización de TGF $\beta$  en MDS, y este fenotipo se puede revertir mediante el tratamiento con un inhibidor de molécula pequeña TGF $\beta$ RI (Zhou et al. (2011) *Cancer Res.* 71: 955-963). De manera similar, en el glioblastoma (GBM), los niveles de ligando TGF $\beta$  están elevados y relacionados con la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que un agente terapéutico de oligonucleótidos antisentido, AP1002, es potencialmente activo en un subconjunto de pacientes con GBM (Bogdahn et al. (2011). *Curr Pharm Biotechnol*). En el melanoma, la activación de señalización de la vía de TGF $\beta$  también se ha relacionado con la resistencia a los inhibidores de BRAF y MEK (Sun et al. (2014) *Nature.* 508: 118-122).

Muchas células malignas secretan el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), un potente inmunosupresor, lo que sugiere que la producción de TGF $\beta$  puede representar un mecanismo de escape tumoral significativo de la inmunovigilancia del huésped (Flavell et. al. (2010) *Nat Rev Immunol* 10:554-567; Kast et. al. (1999) *Leukemia* 13:1188-1199). El establecimiento de una subpoblación de leucocitos con señalización de TGF $\beta$  alterada en el huésped portador de tumores ofrece un medio potencial para la inmunoterapia del cáncer solo o en combinación con una o más inmunoterapias diferentes, por ejemplo, en combinación con uno o más inhibidores de la PD-1 tales como nivolumab, pembrolizumab, inhaladores de PD-L1, vacunas contra el cáncer y por moléculas de acoplamiento inmune específicas tales como IMCgp100. Se ha demostrado en forma preclínica que el ligando de TGF $\beta$  producido por los linfocitos antagoniza la vigilancia inmunológica del tumor (Donkor y otros (2012) *Development. Oncoimmunology* 1: 162-171, Donkor et. al. (2011) *Cytokine Immunity* 35:123-134); se ha demostrado en forma preclínica que la interrupción de este eje proporciona un beneficio antitumoral en modelos murinos e in vitro (Zhong et al. (2010) *Cancer Res* 16: 1191-1205; Petrusch et al. (2009) *J Immunol* 183: 3682-3689); Wakefield et. Alabama. (2013) *nat. Rev Cancer* 13: 328-341). Un modelo animal transgénico con señalización de TGF $\beta$  alterada en células T es capaz de erradicar un tumor de linfoma que sobreexpresa TGF $\beta$  normalmente letal, EL4 (Gorelik y Flavell, (2001) *Nature Medicine* 7(10): 1118-1122). La regulación por disminución de la secreción de TGF $\beta$  en células tumorales da como resultado la restauración de la inmunogenicidad en el huésped, mientras que la insensibilidad de las células T a TGF $\beta$  da como resultado una diferenciación acelerada y autoinmunidad, cuyos elementos pueden ser necesarios para combatir los tumores que expresan autoantígenos en un huésped que ha adquirido tolerancia. Los efectos inmunosupresores de TGF $\beta$  también se han relacionado con una subpoblación de pacientes con VIH con una respuesta inmune inferior que la predicha en función de sus recuentos de células T CD4/CD8 (Garba, et al. *J. Immunology* (2002) 168: 2247-2254). Un anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$  fue capaz de revertir el efecto en el cultivo, lo que indica que los inhibidores de la señalización de TGF $\beta$  pueden ser útiles para revertir la supresión inmune presente en este subconjunto de pacientes con VIH.

Durante las primeras etapas de la carcinogénesis, el TGF- $\beta$ 1 puede actuar como un potente supresor de tumores y puede mediar las acciones de algunos agentes quimiopreventivos. Sin embargo, en algún momento durante el desarrollo y la progresión de las neoplasias malignas, las células tumorales parecen escapar de la inhibición del crecimiento dependiente de TGF- $\beta$  en paralelo con la aparición de TGF- $\beta$  bioactivo en el microambiente. Los papeles duales de supresión de tumores/promoción de tumores de TGF- $\beta$  se han dilucidado más claramente en un sistema transgénico que sobreexpresa TGF- $\beta$  en queratinocitos. Mientras que los transgénicos fueron más resistentes a la formación de lesiones cutáneas benignas, la tasa de conversión metastásica en los transgénicos aumentó drásticamente (Cui, et al (1996) *Cell* 86 (4): 531-42). La producción de TGF $\beta$ 1 por células malignas en tumores primarios parece aumentar con las etapas avanzadas de la progresión tumoral. Los estudios en muchos de los principales cánceres epiteliales sugieren que el aumento de la producción de TGF- $\beta$  por cánceres humanos ocurre como un evento relativamente tardío durante la progresión del tumor. Además, este TGF $\beta$  asociado al tumor proporciona a las células tumorales una ventaja selectiva y promueve la progresión del tumor. Los efectos del TGF $\beta$  sobre las interacciones célula/célula y célula/estroma dan como resultado una mayor propensión a la invasión y la metástasis. El TGF $\beta$  asociado a tumores puede permitir que las células tumorales escapen de la vigilancia inmunológica, ya que es un potente inhibidor de la expansión clonal de los linfocitos activados. También se ha demostrado que TGF $\beta$  inhibe la producción de angiostatina. Las modalidades terapéuticas del cáncer, tales como la radioterapia y la quimioterapia, inducen la producción de TGF $\beta$  activado en el tumor, de este modo se selecciona el crecimiento de células malignas que son resistentes a los efectos inhibidores del crecimiento de TGF $\beta$ . Por lo tanto, estos tratamientos anticancerosos aumentan el riesgo y aceleran el desarrollo de tumores con aumento de crecimiento e invasividad. En esta situación, los agentes dirigidos a la transducción de señales mediada por TGF $\beta$  podrían ser una estrategia terapéutica muy efectiva. Se ha demostrado que la resistencia de las células tumorales al

TGFβ anula muchos de los efectos citotóxicos de la radioterapia y la quimioterapia, y la activación del TGFβ dependiente del tratamiento en el estroma incluso puede ser perjudicial, ya que puede hacer que el microambiente sea más propicio para la progresión tumoral y contribuya al daño tisular que lleva a la fibrosis. El desarrollo de inhibidores de la transducción de señales de TGFβ es probable que beneficie el tratamiento del cáncer progresivo solo y en combinación con otros tratamientos.

Además, se sabe en la técnica que la señalización de TGFβ está implicada en afecciones fibróticas tales como fibrosis hepática y enfermedad renal crónica. Véase por ejemplo, Ueha S, et. Alabama. 2012. 2012. Front Immunol. 3:71. Los mecanismos celulares y moleculares de la fibrosis orgánica asociada a la inflamación crónica; Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis; Bottinger et al. 2002. J Amer Soc Nephrol. 13:2600. TGF- $\beta$  Signaling in Renal Disease; Trachtman H., et al. 2011. Kidney International 79:1236. A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- $\beta$  antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis; and Rosenbloom J, et. al. 2010. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. Ann Intern Med 152: 159-166.

Los siguientes ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados inhiben TGFβR1 en un ensayo bioquímico, a nivel celular y en un modelo animal.

#### **Ensayo bioquímico para la actividad de TGFβR1**

El propósito de esta en el ensayo in vitro es identificar compuestos que inhiben TGFβR1.

#### **Expresión y purificación de proteína**

Se inserta la secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 200-503 de TGFβR1 humano (NM 004612,2) con el aminoácido Thr en la posición 204 cambiada a Asp en el vector PFASTBAC™ 1 (Invitrogen, Cat#10360-014) con la etiqueta HIS N-terminal. Se genera el baculovirus de acuerdo con el protocolo del sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC® (Invitrogen, n.º de cat. 10359-016). Se infectan las células Sf9 a razón de  $1,5 \times 10^6$  células/ml utilizando 15 ml de virus P1 por litro de cultivo y se incuba a 28 °C durante 48 horas. Se recolectan las células y almacenar a -80 °C para la posterior purificación de proteínas. Se realiza la purificación de proteínas a 4 °C. Se suspenden los pellets del cultivo de 2 l en 100 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, imidazol 5 mM, glicerol 10%) que contiene Triton X-100 0,2% y cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA completo Roche y se homogeniza. Se clarifican los lisados celulares mediante centrifugación en un rotor Bechman JA-18 durante 45 minutos a 16,500 rpm. Se incuba el sobrenadante con 5 ml de resina de afinidad metálica Ni-NTA (Qiagen) durante tres horas. Se empaqueta la resina en una columna y se lava con tampón A. Se eluye la proteína HIS-TGFβR1 (200-503) (T204D) con un gradiente de imidazol 0-400 mM en el tampón A. Se mezcla y concentra las fracciones que contiene HIS-TGFβR1 (200-503) (T204D) y se carga en columna HiLoad 16,600 Superdex 200 (GE Healthcare Bioscience). Se eluye la columna con tampón de almacenamiento (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, DTT 1 mM). Se mezcla y concentran las fracciones que contienen HIS-TGFβR1 (200-503) (T204D). Se determina la concentración de proteínas por UV280. Se alícuota la proteína y se almacena a -80 °C.

#### **Condiciones de ensayo TR-FRET**

Se preincuban los compuestos con His-TGFβR1 recombinante (200-503) (T204D), y los anticuerpos de detección Eu-anti-HIS (Invitrogen, Cat #PV5597) en placas negras de semiárea. Se preparan diluciones en serie a partir de compuestos de prueba patrón de 1 mM en DMSO. Se diluye en forma seriada la solución patrón 3 veces en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones de compuesto finales que varían de 2 μM a 0,1 nM. La concentración final de DMSO en el ensayo es de 4%. Se inicia la reacción con la adición de un marcador de quinasa (Kinase Tracer 178, Life Technologies PR9080A, Invitrogen). Después de 45-60 minutos, se lee la fluorescencia en un lector de placas.

Se calcula el porcentaje de inhibición de los grupos tratados con compuesto con respecto al grupo de inhibición mínima (DMSO solo, sin tratar). Se calcula la IC<sub>50</sub> absoluta utilizando una ecuación logística no lineal de 4 parámetros donde la IC<sub>50</sub> absoluta = concentración que causa una inhibición del 50% utilizando el software de análisis de datos ActivityBase. Los resultados de estos ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados son inhibidores efectivos de TGFβR1. Por ejemplo, todos los compuestos ejemplificados demuestran valores de IC<sub>50</sub> menores de 1 μM. Específicamente, la IC<sub>50</sub> para el Ejemplo 1 es 0,027 μM.

#### **Ensayo indicador de luciferasa basado en células para la actividad de TGFβR1**

El propósito de este ensayo es identificar compuestos que interfieren selectivamente en la expresión génica dependiente de SMAD 2,3 en ensayos basados en células que demuestran que inhiben el TGFβR1 a nivel celular.

Se manipulan genéticamente células HEK293 (ATCC, CRL-1573) para expresar luciferasa de luciérnaga a partir de un promotor sensible a SMAD 2,3 en respuesta a la estimulación con TGFβ. Dicha línea celular se puede generar a través de la infección con partículas lentivirales (SA Biosciences) y la selección de resistencia a la puromicina. Se siembran las células HEK293\_SMAD 2/3 de los patrones congelados listas para el ensayo a razón de 15,000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medio OPTI-MEM® que contiene un 10% de suero bovino fetal. Después de 72 horas, se cambia el medio a OPTI-MEM® que contiene 0,1% de albúmina sérica bovina. Se

preparan compuestos de prueba en DMSO para obtener soluciones patrón 10 mM. Se diluyen en forma seriada las soluciones patrón 3 veces en DMSO para obtener una curva de dilución de diez puntos con concentraciones finales de compuestos que varían de 20  $\mu\text{M}$  a 1 nM con la concentración final de DMSO en el ensayo es de 0,5%. Se añaden los compuestos de prueba y después de una hora de equilibrio, se añade TGF $\beta$  (concentración final = 2 nM, R&D Systems).

Después de 24 horas, se añade el tampón de lisis [tampón de lisis Glo (Cat #E2661)] y el reactivo de luciferasa [Reactivo de luciferasa Promega Bright Glo #E2620] a cada pocillo para duplicar el volumen del pocillo. Se transfieren alícuotas (80  $\mu\text{L}$ ) a placas de fondo sólido blanco para leer la luminiscencia en un lector de placas (Filtro de emisión: Luminiscencia 700, lectura de 1 segundo). Se calcula el porcentaje de inhibición de los grupos tratados con compuesto con respecto al grupo de inhibición mínima (DMSO solo, sin tratar). Se calcula la  $\text{IC}_{50}$  relativa para cada compuesto a partir de un estudio de respuesta a la dosis y es la concentración necesaria para lograr una inhibición del 50%. Se ajustan los datos generados de los estudios de dosis-respuesta a una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando el software de análisis de datos ActivityBase. Los resultados de estos ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados son inhibidores efectivos de la actividad indicadora de luciferasa de las células HEK293\_SMAD2/3 estimuladas con TGF $\beta$ . Por ejemplo, todos los compuestos ejemplificados demuestran valores de  $\text{IC}_{50}$  menores de 1  $\mu\text{M}$ . Específicamente, la  $\text{IC}_{50}$  para el Ejemplo 1 es 0,0824  $\mu\text{M}$  ( $\pm$  0,005,  $n = 2$ ).

### **Ensayo de IVTI**

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la expresión de pSMAD2 en tumores en un modelo animal singénico EMT6-LM2, en otras palabras, el ensayo mide la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la señalización de TGF $\beta$ RI en un modelo animal de tumor sólido.

#### **Generación de células EMT6-LM2**

Se implantan células EMT-6 (ATCC, CRL-2755) por vía subcutánea (5 x 10<sup>5</sup>/animal) en el flanco de ratones BALB/cAnNHsd inmunocompetentes (Harlan Laboratories). Cuando los tumores alcanzan aproximadamente 3000 mm<sup>3</sup>, se sacrifican los animales por asfixia con CO<sub>2</sub>. Se aíslan los pulmones de los animales vehículos de tumores y se colocan en cultivo. Se homogenizan suavemente los pulmones para crear una suspensión celular única. Se cultivan las células en medios de cultivo (IMDM, FBS 10%) y se aíslan las células tumorales para obtener células EMT6-LM1. Se repite el proceso anterior usando células EMT6-LM1 para la implantación para generar células EMT-LM2.

#### **Fosfo HIS-SMAD2 purificado(pSMAD2)**

Se inserta la secuencia de nucleótidos que codifica el SMAD2 humano de longitud completa (NM\_005901,5) en el vector PFASTBACHTA™ (Invitrogen, Cat#10584-027), lo que da como resultado el constructo del baculovirus para expresar la proteína HIS-SMAD2. Se inserta la secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 148-503 del TGF $\beta$ R1 humano (NM\_004612,2) con el aminoácido Thr en la posición 204 cambiada a Asp en el vector PFASTBACHTA™ (Invitrogen, Cat. 10584-027), lo que da como resultado el constructo del baculovirus para la expresión de la proteína de HIS-TGF $\beta$ R1 (148-503) (T204D). Se genera el baculovirus de acuerdo con el protocolo del sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC® (Invitrogen). Se infectan las células Sf9 a 1,5 x 10<sup>6</sup> células/ml utilizando 10 ml de virus P1 de HIS-SMAD2 y virus P1 de HIS-TGF $\beta$ R1 (148-503) (T204D) por litro de cultivo y se incuba a 28 °C durante 45 horas. Se añade ácido okadaico a una concentración final de 0,1  $\mu\text{M}$ . Después de tres horas adicionales de incubación, se recolectan las células y almacenan a -80 °C para la posterior purificación de proteínas. Se lleva a cabo la purificación de proteínas a 4 °C. Se lisan los pellets celulares congelados de 6 l de cultivo por incubación con agitación en 300 ml de tampón A frío (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, mercaptoetanol 2 mM, imidazol 5 mM, glicerol 10%, ácido okadaico 0,1 mM) que contiene un TRITON® X-100 0,1% y cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA completo de Roche y se homogeniza. Se clarifican los lisados celulares mediante centrifugación en un rotor Bechman JA-18 durante 45 minutos a 16,500 rpm. Se incuba el sobrenadante con 10 ml de resina de afinidad de metal TALON (Clontech, Cat #635504) durante dos horas. Se lava el lote con 100 ml de tampón A que contiene TRITON® X-100 0,1%. Se empaqueta la resina en una columna y se lava con tampón A. Se eluye la proteína HIS-SMAD2 con un gradiente de imidazol 0-100 mM en el tampón A. Se mezclan las fracciones que contienen fosfo HIS-SMAD2 y se suplementa con ácido okadaico 0,1  $\mu\text{M}$  y EDTA 5 mM. Se determina la concentración de proteínas mediante el ensayo de proteínas BioRad (kit de ensayo de proteínas BioRad DC #500-0116) utilizando BSA como estándar. Se alícuota la proteína y se almacena a -80°C.

#### **Fase in vivo**

Se cultivan células EMT6-LM2 en medio de Dulbecco modificado Insoves (MDM) suplementado con FBS 10%, glutamax 2 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM y se incuba a 37 °C en CO<sub>2</sub> 5%. Se tripsinizan y aíslan las células del cultivo. Se resuspenden las células en solución salina equilibrada de Hank (HBSS), posteriormente se mezclan con MATRIGEL® (1: 1). Se implantan las células (5 x 10<sup>5</sup>/animal) por vía subcutánea en el flanco posterior de los ratones (ratones BALB/c hembra, Harlan). Se mide el volumen del tumor con un calibre y el peso corporal dos veces por semana. Después de que el volumen del tumor alcanza aproximadamente 200-250 mm<sup>3</sup>, se aleatorizan los animales y se agrupan en grupos de control de vehículo y de tratamiento con el compuesto. Se administra el compuesto (formulado en hidroxietilcelulosa 1% (HEC) y TWEEN® 80 0,25% y antiespumante 0,05%)

y control del vehículo (HEC 1% y TWEEN® 80 0,25% y antiespumante 0,05%) mediante cebadura oral. Genere la respuesta a la dosis mediante el análisis de los compuestos en un punto de tiempo único (2 horas) después de una dosis única de: 2,7, 8,3, 25, 75 o 150 mg/kg. Se realiza un curso de tiempo en la dosis calculada (procedimiento detallado a continuación) TED<sub>50</sub> o TED<sub>80</sub> de un estudio de dosis respuesta sacrificando a los ratones en múltiples puntos de tiempo entre 1 hora y 16 horas después de una dosis única.

#### Procesamiento del tejido

Se recolectan los tejidos tumorales y se homogenizan como se describe a continuación. Se congelan los tejidos tumorales (-100 mg cada uno) en nitrógeno líquido y se pulverizan con una mano de mortero. Se coloca el tejido pulverizado en un tubo (Tubo A de matriz de lisado, MPBio #6910-100) en hielo seco y se homogeniza en un tampón de lisis (0,6 ml cada uno) (NaCl 150 mM; Tris 20 mM, pH 7,5; ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (EDTA); ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 1 mM; TRITON® X-100 1%; cóctel inhibidor de proteasa (Sigma P8340); cóctel inhibidor de fosfatasa II (Sigma P5726); cóctel inhibidor de fosfatasa III (Sigma P0044)) durante 25 segundos usando un homogeneizador Bio101 FASTPREP® FP120 (ajuste 4,5). Se hacen sedimentar los desechos celulares y las perlas por centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfiere el lisado a un nuevo tubo de microcentrífuga y se vuelve a centrifugar, a 14,000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfiere el lisado centrifugado a una placa de 96 pocillos profundos y se mantiene en hielo. Se determina la concentración de proteína para cada lisado utilizando un ensayo de proteínas BioRad (kit de ensayo de proteínas BioRad DC #500-0116) de la siguiente manera. Se prepara el reactivo de trabajo agregando el reactivo de kit S (20 µL) a cada 1 ml de reactivo de kit A necesario para el ensayo. Se preparan 3-5 diluciones de una proteína estándar de 0,2 mg/ml a 1,5 mg/ml de proteína y se genera una curva estándar. Se pipetea 5 µL de estándares y muestras en una placa de microtitulación limpia y seca. Se añaden 25 µL de reactivo de trabajo a cada pocillo. Se añaden 200 µL de reactivo B en cada pocillo y se agita durante 5 segundos. Después de 15 minutos, se lee la absorbancia de cada pocillo a 750 nM. Los niveles de proteína para cada pocillo se determinan comparando la absorbancia de los pocillos de muestra con la curva estándar derivada de los pocillos estándar. Se normalizan los lisados tumorales a 10 mg/ml con tampón de lisis en preparación para el análisis de pSMAD2 y SMAD2/3 total mediante ELISA como el procedimiento descrito a continuación.

#### ELISA SMAD

Los lisados tumorales se analizan utilizando placas ELISA independientes, donde una placa se usa para determinar los niveles totales de SMAD 2/3 y la otra placa se usa para determinar los niveles de fosfo SMAD 2. Mientras que el anticuerpo de revestimiento es el mismo para ambas placas, el anticuerpo secundario es específico para SMAD 2/3 total o fosfo SMAD 2. Estas placas se denominan colectivamente "placas ELISA" y, por separado, como "placa ELISA total" o "placa ELISA fosfo", respectivamente. Se prepara el anticuerpo de revestimiento a 2,5 µg/ml en BupH tampón carbonato-bicarbonato (anticuerpo monoclonal anti-SMAD 2/3, BD Biosciences #610843; BupH carbonato-bicarbonato de Pierce #28382) y se añaden a razón de 100 µl por pocillo a inmunoplaacas de 96 pocillos (Thermo Scientific #439454) y se incuba durante la noche a 4 °C en un agitador de plataforma para generar las placas ELISA. A continuación, se lavan las placas ELISA cuatro veces con tampón de lavado (TWEEN® 20 0,5% en solución salina tamponada con tris (TBS), pH 8,0 de Sigma #T-9039) y posteriormente se bloquea con 200 µl por pocillo de tampón de bloqueo (albúmina sérica bovina 1% (BSA) en 1 x TBS) a temperatura ambiente en un agitador de plataforma durante dos horas. Se lava cuatro veces con tampón de lavado. A la placa ELISA de fosfo SMAD, se añaden 100 µL por pocillo de lisado tumoral o lisado de vehículo a 10 mg/ml a los pocillos apropiados. A la placa ELISA total, se añaden 98 µL por pocillo de tampón de lisis y 2 µl por pocillo de 10 mg/ml de lisado tumoral o vehículo lisado a los pocillos apropiados (0,02 mg de lisado de proteína final). También se agrega una curva estándar a cada placa ELISA (fosfo y total) usando pSMAD2 purificado. Se incuba durante la noche. Se lavan las placas ELISA de nuevo cuatro veces con tampón de lavado. Se preparan anticuerpos secundarios (anticuerpo monoclonal de conejo anti-fosfo SMAD2 Millipore #04-953; anticuerpo policlonal de conejo anti-SMAD2/3 Millipore #07-408) a una dilución de 1: 500 en tampón de lisis suplementado con BSA 1% y se añaden 100 µL por pocillo a la placa correspondiente. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante dos a tres horas. Se lavan cuatro veces con tampón de lavado y se añaden 100 µL por pocillo de anticuerpo indicador (HRP anti-conejo, GE Healthcare #NAV934V, diluido 1: 10,000 en tampón de bloqueo) a las placas. Se incuba durante una hora a temperatura ambiente y se lavan las placas cuatro veces con tampón de lavado y se añaden 100 µl por pocillo a temperatura ambiente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; Surmodics/BioFX #TMBW-0100-01 ). Se incuban las placas a 37 °C durante hasta treinta minutos. Se detiene la reacción con la adición de 100 µL de solución de detención (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N). Se lee la absorbancia (OD) a 450 nm en un lector de placas.

Se usa la relación de SMAD total (tSMAD) a fosfo SMAD (pSMAD) para el grupo del vehículo para determinar la inhibición mínima (0%) de la señal de pSMAD. Se calcula el porcentaje de inhibición para los grupos tratados con compuesto en relación con la inhibición mínima de pSMAD del grupo del vehículo. Se calcula la TED<sub>50</sub> y TED<sub>80</sub> a partir de un estudio de dosis respuesta (dosis necesaria para lograr una inhibición de 50% y 80% en este momento, respectivamente) utilizando el procedimiento NLIN en SAS (Versión 9,3, Cary, NC). Este ensayo demuestra que el Ejemplo 1 tiene un valor de TED<sub>50</sub> de 10,8 mg/kg 2 horas después de 1 dosis y una TED<sub>80</sub> de 24,1 mg/kg. En el estudio del curso de tiempo en la dosis TED<sub>50</sub> (11 pmk), el Ejemplo 1 demuestra una inhibición de 48% en una hora y una inhibición de 39% en dos horas después de la dosificación. En el estudio del curso de tiempo en (25 mpk), el Ejemplo 1 demuestra una inhibición de 71% a la hora y una inhibición de 70% a las dos horas después de la

dosificación.

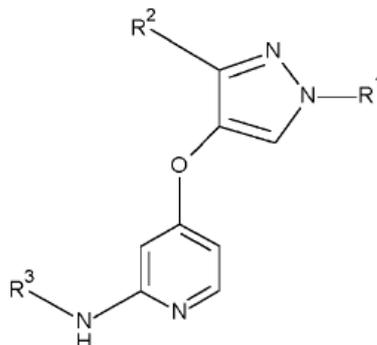
5 Los compuestos de la presente invención son generalmente efectivos en un amplio intervalo de dosis. Por ejemplo, las dosis por día normalmente se hallan dentro del intervalo diario de aproximadamente 1-2000 mg. Preferiblemente, tales dosis se hallan dentro del intervalo diario de 10-1000 mg. Más preferiblemente, tales dosis se hallan dentro del intervalo diario de 10-80 mg. Incluso más preferiblemente, tales dosis se hallan dentro del intervalo diario de 10-50 mg. Con máxima preferencia, tales dosis se hallan dentro del intervalo diario de 10-50 mg. En algunos casos, los niveles de dosis por debajo del límite inferior de los intervalos mencionados anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores, y por lo tanto los intervalos de dosis anteriores no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Se entenderá que la cantidad del compuesto realmente administrado será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluida la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente.

10

15

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



en la que:

5 R<sup>1</sup> es hidrógeno, isopropilo, difluorometilo, difluoroetilo, o ciclopropilo;

R<sup>2</sup> es etilo, terc-butilo, piridin-2-ilo, tetrahidropiran-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, ciclopropilo, o ciclobutilo; y R<sup>3</sup> es carbamoilfenilo, piridin-2-ilo, (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo, 1-metil-2-oxo-1H-piridin-4-ilo, 1-metilpirazolilo, pirazin-2-ilo, 2-metoxipirimidin-4-ilo, 1-metil-2-oxo-1H-pirimidin-4-ilo, piridazin-3-ilo, 6-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-metoxipiridazin-3-ilo;

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto o sal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que es 4-metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol.

15 4. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es 4-metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol cristalino.

20 5. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es 4-metilbencensulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol cristalino **caracterizado porque** el patrón de difracción de rayos X del polvo (radiación Cu,  $\lambda$ -1,54060 Å) comprende un pico a 17,8° con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 19,7°, 18,4°, y 22,0° ( $2\theta \pm 0,2^\circ$ ).

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

25 7. Un compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar en terapia.

8. Un compuesto o sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar en el tratamiento del cáncer.

30 9. Un compuesto o sal para usar de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer renal, glioblastoma, cáncer pancreático, síndrome mielodisplásico, cáncer de pulmón y cáncer gástrico.

10. Un compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar en el tratamiento de fibrosis.

11. Un compuesto o sal para usar de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.

35