



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-709

54. TITULO

"DERIVADOS DE PIRROLO [3,4-C] PIRAZOL ACTIVOS COMO INHIBIDORES DE
QUINASA, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS
QUE LOS COMPRENDEN."

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

C07D 487/04, A61K 31/4162, 31/5355
A61P 35/00.

71. SOLICITANTE

PHARMACIA ITALIA S.p.A

DOMICILIO

MILÁN, ITALIA

74. APODERADO

ALVARO CORREA ORDOÑEZ
TP. 20.281

22. BOGOTA, D.C., ENERO 4, 2006

PETITORIO

000001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 06000709 00000000

Folios: 124

Fecha (IMP): 2006-01-04 16:54:16

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

icación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 2006-02-09

①

SOLICITUD DE :

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

②

SOLICITANTE

(71)

Nombre: PHARMACIA ITALIA S.p.A.

Dirección: Via Robert Koch, 1.2, I-20052 Milán, Italia

Nacionalidad o Domicilio: Italiana

Lugar de Constitución: Milán, Italia

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o.

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: patents.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.143.366

TP 20.281

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: FANCELLI, Daniele; FORTE, Barbara; MOLL, Jurgén; VARASI, Mario y VIANELLO, Paola

Dirección: Via Montecuccoli 8, I-20147 Milán, Italia; Via Morandi 5, I-20090 Buccinaio, Italia; Localita San Bartolomeo, I-22070 Appiano Gentile, Italia; Via Moncucco, 24/a, I-20142 Milán, Italia y Via Trebazio 6, I-20145 Milán, Italia

Nacionalidad o Domicilio: Italiana; Italiana; Alemán; Italiano e Italiana

⑤

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/007515

Fecha Julio 8, 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/005427 A1

Fecha Enero 20, 2005

⑥

Título (54)

DERIVADOS DE PIRROLO [3,4-c] PIRAZOL ACTIVOS COMO INHIBIDORES DE QUINASA,

PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS COMPRENDEN.

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07D 487/04, A61K 31/4162, A61P 35/00, A61K 31/5355.

⑧

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

60/485,814

(32) Fecha

Julio 9, 2003

(31) Número de Solicitud

US

⑨

Comprobante de pago No. 05-32,486 y 05-71,298

Fecha 04-MAY-05 y 15-SEP-05

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10

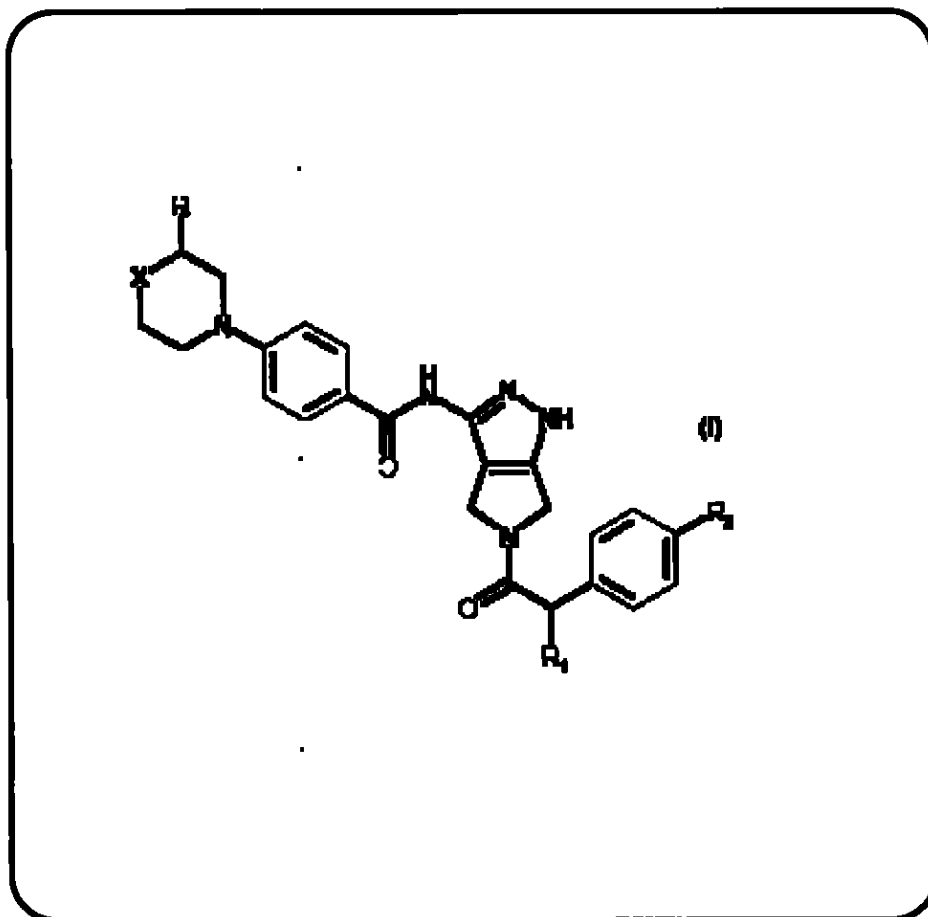
ANEXOS

000002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, al fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros:

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de
Usaquén

T.P. 20.281

000003

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 06000709 00000000 Folios: 124
 Fecha (MS): 2006-01-04 16:54:16
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 32,466
 FECHA : MAYO 4 DE 2005

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDONEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37739480	04/05/2005	96,012,000.00

CONCEPTO

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	443,000.

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

7269

000004

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 86000749 00000000

Folios: 124

Fecha (AMB): 2006-01-04 16:54:16

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 5 - 71,298

FECHA : SEPTIEMBRE 15 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CORREA ORDONEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	27550373	15/09/2005	78,736,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRANI	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

POD-02544

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 078/05 de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 17 de febrero de 2005 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por PHARMACIA ITALIA S.p.A. para su representación en relación con asuntos de propiedad Industrial en Colombia. Certificación notarial suscrita por Jane E. Callahan, Notario Público del estado de Nueva York, EE.UU., y legalizaciones subsiguientes.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

EL PODER NO SE TRADUCE POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

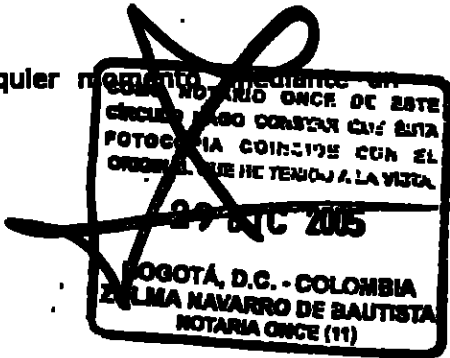
PODER GENERAL

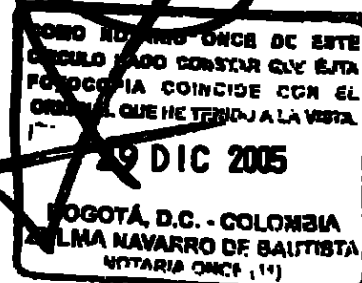
Otorgado a Grover F. Fuller Jr. /

con dirección Pfizer Inc.
 150 East 42nd Street
 New York, NY 10017-5612
 E.U.A.

o a quien él pueda designar, para actuar en su nombre como nuestro representante en todos los países, en asuntos relacionados con solicitudes de patentes o diseños o en relación con la protección otorgada, con autoridad para suscribir cartas y documentos respecto de estos asuntos a nombre de la firma PHARMACIA & UPJOHN SpA.

Este poder podrá ser revocado en cualquier momento mediante un





Traducción Oficial No. 078/05 - Página 3

cuyo nombre suscribe el testimonio, declaración, certificado de reconocimiento o prueba adjunto, era en el momento de recibir el mismo una NOTARIO PUBLICO en y para el Estado de Nueva York, debidamente comisionada, juramentada y calificada para actuar como tal; que conforme a la ley, una comisión o un certificado de su carácter oficial, con su firma autógrafa, ha sido registrado en mi oficina; que en el momento de recibir dicha prueba, reconocimiento o juramento estaba debidamente autorizada para ello; que conozco bien la letra manuscrita de dicha NOTARIO PUBLICO o he comparado la firma que aparece en el Instrumento adjunto con su firma autógrafa depositada en mi oficina y considero que dicha firma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, he firmado el presente y estampado mi sello oficial a los 27 días del mes de julio de 2004.

TERESA LARA R.
TRADUCCIONES OFICIALES
INSTRUMENTOS NOTARIALES
DE MINISTROS

(Firmado) Norman Goodman

Secretario del Condado y Secretario del
Tribunal Supremo, Condado de Nueva York

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

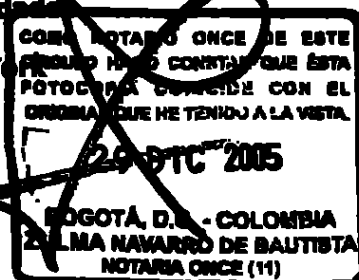
1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Norman Goodman

3. actuando en calidad de Secretario del Condado

4. lleva el sello/timbre del condado de Nueva York



Traducción Oficial No. 078/05 - Página 4

Certificado

- | | |
|--|-------------------------------|
| 5. en Nueva York, Nueva York | 6. el día 9 de agosto de 2004 |
| 7. por el Subsecretario de Estado Especial, Estado de Nueva York | |
| 8. No. NYC-10299517A | |
| 9. Sello/Timbre | 10. Firma |

(El Gran Sello del
Estado de Nueva York)

(Fdo.) James Bizzarri

James Bizzarri
Subsecretario de Estado Especial

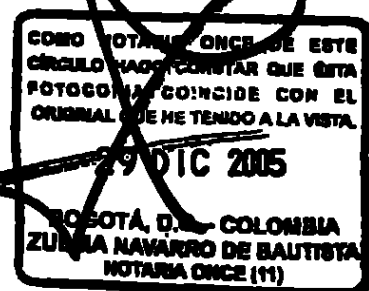
=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

Teresa Lara R.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



000007

105

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

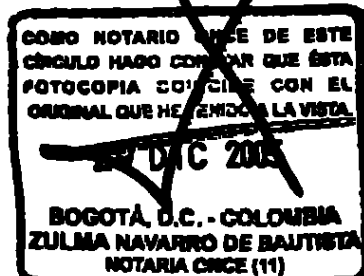
Certified

5. At New York, New York
6. the 09th day of August 2004
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10299517A
9. Seal/Stamp
10. Signature

James Blizzarri

James Blizzarri
Special Deputy Secretary of State

04130001RBL (REV: 2/99)



Maria Teresa Lara R.
MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01018
DE MEDELLIN

215/04
098/03

CON NOTARIO ONCE DE ESTE
CIRCULO HA CONSTATADO QUE ESTA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL
ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
29 DIC 2005
BOGOTA D.C. - COLOMBIA
ALMA NAVARRO DE SAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

PHARMACIA ITALIA S.p.A.

Reisbach, Lara, Rodríguez & Rosales
Av. 82 No. 10 - 62 8th Floor
Bogotá, Colombia

NTT: 800.088.840-8
Tel: +57 1 694 1830
Fax: +57 1 378 2211
www.bolamail.com

LEGALIZE

POWER OF ATTORNEY

The undersigned,

PHARMACIA ITALIA S.p.A.

domiciled in

**VIA ROBERT KOCH, 1,2
I-20152
MILANO, ITALY**

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or OLGA
GEORGETTE OTERO and/or RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of

my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, or administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, resolve, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

PHARMACIA ITALIA S.p.A.

By

Grover F. Fuller, Jr.
Name typewritten: Grover F. Fuller, Jr.
Title: Authorized Attorney

Done and subscribed in *New York, NY*

On the *25* day of *June* of 2004

Signature of the person issuing the Power

La abajo firmada,

PHARMACIA ITALIA S.p.A.

domiciliada en

**VIA ROBERT KOCH, 1,2
I-20152
MILÁN, ITALIA**

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or OLGA GEORGETTE
OTERO and/or RICARDO METKE and/or JUAN PABLO
CONCHA**

con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de:

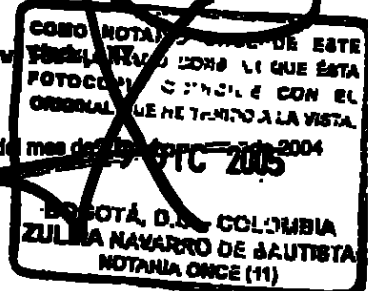
mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

Iguualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de esta sociedad.

Dado y firmado en *New York, NY*

A los *25* días del mes de *junio* de 2004

Firma de la persona que firma el Poder



107

11/11/04

PHARMACIA

Pharmacia & Upjohn S.p.A.
Via Robert Koch, 12
20152 Milano, Italia
telefono +39 0248381
telefax +39 0248382734

GENERAL POWER OF ATTORNEY

For anyone Grover F. Fuller Jr.

with the address Pfizer Inc.
150 East 42nd Street
NEW YORK, NY 10017-5612
U.S.A.

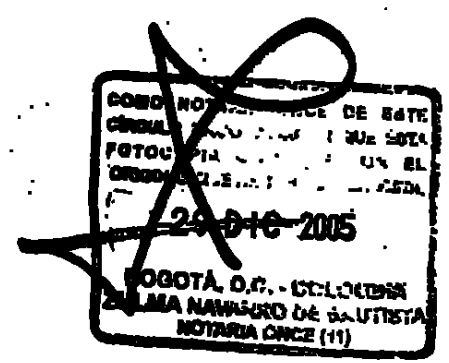
or anyone that he may appoint in his stead, to act as our representative in all countries, in matters in connection with applications for patents or designs or in connection with such protection granted, and on letters and documents in these matters be authorized to sign for the firm of PHARMACIA & UPJOHN SpA.

This power of attorney may be revoked at any time by a written instrument executed by a duly authorized officer of PHARMACIA & UPJOHN SpA.

Date 02/25/04



Emanuele Barié
President



10000010

10000010

108

2

NOTARIAL CERTIFICATION

CERTIFICACION NOTARIAL

On this 24th day of June
2004, the undersigned Notary

A los 24 días del mes de Junio
de 2004, el suscrito Notario

CERTIFIES

DA FE

1. That Grover F. Fuller, Jr.
of legal age and domiciled in Via Robert Koch, 1.2
I-20152 Milano, Italy
set his hand on the foregoing document.
2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.
3. That the grantor has executed the foregoing document as
Authorized Attorney

- 1 Que Grover F. Fuller, Jr.
mayor y domiciliado en Via Robert Koch, 1.2
I-20152 Milano, Italia
suscrió de su puño y letra el documento que antecede.
- 2 Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.
- 3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
Abogado Autorizado

of the judicial person PHARMACIA ITALIA S.p.A.

de la persona jurídica PHARMACIA ITALIA S.p.A.

4. That the judicial person PHARMACIA ITALIA S.p.A.

- 4 Que la persona jurídica PHARMACIA ITALIA S.p.A.

having its home office in
VIA ROBERT KOCH, 1.2
I-20152
MILANO, ITALY

con sede en
VIA ROBERT KOCH, 1.2
I-20152
MILÁN, ITALIA

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

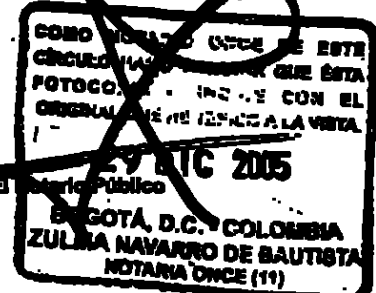
5. That the grantor has in fact the referred authority and that his/her representation is legal.
6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

- 5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.
- 6 Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que el efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Certificate of Incorporation
No. 99073/8578 (14 September 2001)
Notary Public, State of New York
No. 01CA468877
Qualified in New York County
Commission Expires 12/11/2005

Certificado de Incorporación
No. 99073/8578 (14 Septiembre 2001)

Notary Public



CLERK

NEW YORK

State of New York
County of New York

No. 389290 Page 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Norman Goodman

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

JUL 27 2004

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

COMO NOTARIO EN DE ESTE
CIRCULO HAYO ASESOR QUE ESTA
FOTOCOPIA ORIGINAL CON EL
ORIGINAL QUE: LA VISTA

29 DIC 2005

BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 January 2005 (20.01.2005)

PCT

(16) International Publication Number
WO 2005/005427 A1

(51) International Patent Classification⁷: C07D 487/04,
A61K 31/4162, A61P 35/00

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/007515

(22) International Filing Date: 8 July 2004 (08.07.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/485,814 9 July 2003 (09.07.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PHAR-
MACIA ITALIA S.P.A. [IT/IT]; Via Robert Koch, 1.2,
I-20152 Milano (IT).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): FANCELLI,
Dante [IT/IT]; Via Montecuccoli, 8, I-20147 Milan
(IT). FORTE, Barbara [IT/IT]; Via Morandi 5, I-20090
Buccinasco (IT). MOLI, Jürgen [DE/IT]; Località San
Bartolomeo, I-22070 Appiano Gentile (IT). VARASI,
Mario [IT/IT]; Via Moncucco, 24/a, I-20142 Milano (IT).
VIANELLO, Paola [IT/IT]; Via Trebuzio 6, I-20145
Milano (IT).

(74) Agent: MODIANO, Mirella, Nadia; Modiano Josef
Pintny & Stroh, Bismarckstrasse 3, 80469 München (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NR, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/005427 A1

(54) Title: PYRROLO[3,4-c]PYRAZOLE DERIVATIVES ACTIVE AS KINASE INHIBITORS

(57) Abstract: Pyrrolo[3,4-c]pyrazole derivatives of formula (I) and pharmaceutically acceptable salts thereof, as defined in the specification, process for their preparation and pharmaceutical compositions comprising them are disclosed; the compounds of the invention may be useful, in therapy, in the treatment of diseases associated with a dysregulated protein kinase activity, like cancer.

TITLE OF THE INVENTION

5

**PYRROLO '3,4-C' PYRAZOLE DERIVATIVES ACTIVE
AS KINASE INHIBITORS**

10

BACKGROUND OF THE INVENTION**Field of the Invention**

The present invention relates to pyrrolo-pyrazole derivatives, to a process for their preparation, to pharmaceutical compositions comprising them, and to their use as therapeutic agents, particularly in the treatment of cancer and cell proliferation disorders.

Discussion of the Background

The malfunctioning of protein kinases (PKs) is the hallmark of numerous diseases. A large share of the oncogenes and proto-oncogenes involved in human cancers code for PKs. The enhanced activities of PKs are also implicated in many non-malignant diseases, such as benign prostate hyperplasia, familial adenomatosis, polyps, neuro-fibromatosis, psoriasis, vascular smooth cell proliferation associated with atherosclerosis, pulmonary fibrosis, arthritis, glomerulonephritis and post-surgical stenosis and restenosis.

PKs are also implicated in inflammatory conditions and in the multiplication of viruses and parasites. PKs may also play a major role in the pathogenesis and development of neurodegenerative disorders.

For a general reference to PKs malfunctioning or deregulation see, for instance, Current Opinion in Chemical Biology 1999, 3, 469 - 485.

CONFIRMATION COPY

Among the several protein kinases known in the art as being implicated in the growth of cancer cells are Aurora kinases, in particular Aurora-2.

Aurora-2 was found to be over-expressed in a number of different tumor types. Its gene locus
5 maps at 20q13, a chromosomal region frequently amplified in many cancers, including breast
[Cancer Res. 1999, 59(9), 2041-4] and colon.

20q13 amplification correlates with poor prognosis in patients with node-negative breast
cancer and increased Aurora-2 expression is indicative of poor prognosis and decreased
10 survival time in bladder cancer patients [J. Natl. Cancer Inst., 2002, 94(17), 1320-6]. For a
general reference to Aurora-2 role in the abnormal centrosome function in cancer see also
Molecular Cancer Therapeutics, 2003, 2, 589 - 595.

SUMMARY OF THE INVENTION

15 It is an object of the invention to provide compounds, which are useful in therapy as agents
against a host of diseases caused by and/or associated to a deregulated protein kinase
activity and, more particularly, Aurora kinases activity.

It is another object to provide compounds, which are endowed with protein kinase inhibiting
20 activity and, more particularly, Aurora kinases inhibiting activity.

The present inventors have now discovered that some pyrrolo-pyrazoles, and derivatives
thereof, are endowed with protein kinase inhibiting activity, e.g. Aurora kinases inhibiting
25 activity.

More specifically, the compounds of this invention are useful in the treatment of a variety of
cancers including, but not limited to: carcinoma such as bladder, breast, colon, kidney, liver,
lung, including small cell lung cancer, esophagus, gall-bladder, ovary, pancreas, stomach,
cervix, thyroid, prostate, and skin, including squamous cell carcinoma; hematopoietic tumors
30 of lymphoid lineage, including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic
leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's
lymphoma, hairy cell lymphoma and Burkett's lymphoma; hematopoietic tumors of myeloid
lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias, myelodysplastic syndrome and
promyelocytic leukemia; tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma and

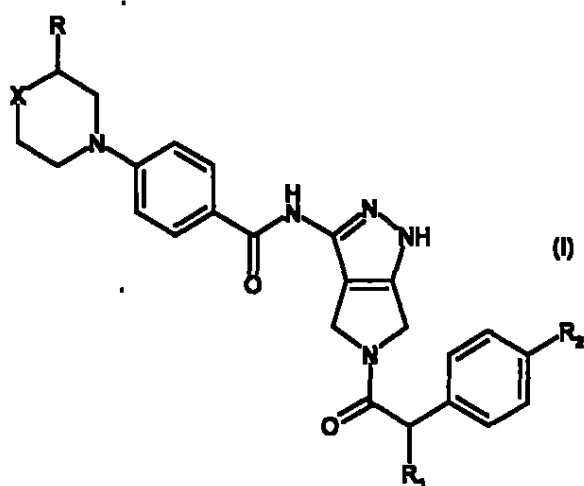
rhabdomyosarcoma; tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma and schwannomas; other tumors, including melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, keratoacanthoma, thyroid follicular cancer and Kaposi's sarcoma.

5

Due to the key role of PKs and Aurora kinases in the regulation of cellular proliferation, these pyrrolo-pyrazoles are also useful in the treatment of a variety of cell proliferative disorders such as, for instance, benign prostate hyperplasia, familial adenomatosis, polyps, neuro-fibromatosis, psoriasis, vascular smooth cell proliferation associated with atherosclerosis, pulmonary fibrosis, arthritis glomerulonephritis and post-surgical stenosis and restenosis.

Accordingly, in a first embodiment, the present invention provides a method for treating cell proliferative disorders caused by and/or associated with an altered protein kinase activity, which comprises administering to a mammal in need thereof an effective amount of a compound of formula (I)

15



wherein

20 R is hydrogen or methyl;

R₁ is hydroxy or a straight or branched C₁-C₂ alkyl or alkoxy group;

R₂ is a hydrogen or halogen atom;

X is a divalent group selected from methylene (-CH₂-) or fluoromethylene (-CHF-), or it is a heteroatom or heteroatomic group selected from oxygen (-O-) or nitrogen (-NR'-) wherein R' is a hydrogen atom, a straight or branched C₁-C₄ alkyl group or a C₃-C₆ cycloalkyl group; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

The above method enables treatment of cell proliferative disorders caused by and/or associated with altered Aurora Kinases activity.

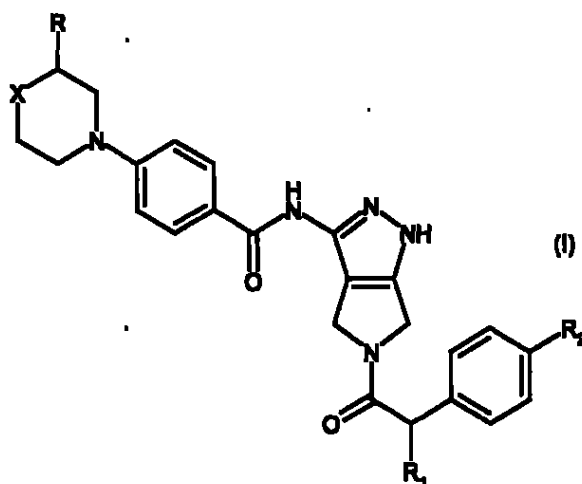
10

In a preferred embodiment of the method described above, the cell proliferative disorder is cancer.

Specific types of cancer that may be treated include carcinoma, squamous cell carcinoma, hematopoietic tumors of myeloid or lymphoid lineage, tumors of mesenchymal origin, tumors of the central and peripheral nervous system, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, keratoanthoma, thyroid follicular cancer, and Kaposi's sarcoma.

15

The present invention also provides a compound of formula (I)



20

wherein

R is hydrogen or methyl;

R₁ is hydroxy or a straight or branched C₁-C₄ alkyl or alkoxy group;

R_2 is a hydrogen or halogen atom;
X is a divalent group selected from methylene ($-\text{CH}_2-$) or fluoromethylene ($-\text{CHF}-$), or it is a heteroatom or heteroatomic group selected from oxygen ($-\text{O}-$) or nitrogen ($-\text{NR}'-$) wherein R' is a hydrogen atom, a straight or branched C_1-C_4 alkyl group or a C_2-C_6 cycloalkyl group;
5 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The present invention also includes methods of synthesizing the pyrrolo-pyrazoles of formula (I) and the pharmaceutically acceptable salts, as well as the pharmaceutical compositions comprising them.

10

A more complete appreciation of the invention and many of the attendant advantages thereof will be readily obtained as the same becomes better understood by reference to the following detailed description.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Several heterocyclic compounds are known in the art as protein kinase inhibitors. Among them, 3-carboxamido-pyrazoles and 3-ureido-pyrazoles and derivatives thereof, have been disclosed as protein kinase inhibitors in the International patent applications WO 01/12189, WO 01/12188, WO 02/48114 and WO 02/70515, all in the name of the applicant
20 itself.

Fused bicyclic compounds comprising pyrazole moieties and possessing kinase inhibitory activity have been also disclosed in WO 00/89848, WO 02/12242 as well as WO 03/028720 and still unpublished PCT/EP03/04862 application (claiming priority from US patent
25 application 60/381082, filed in May 17, 2002), all in the name of the applicant itself.

In addition to the above, aminophenyl-piperazine or aminophenyl-piperidine derivatives as possessing inhibitory activity towards prenyl transferase proteins are disclosed in WO 02/30827 in the name of Pierre Fabre Medicament.

30

The compounds of the present invention fall within the scope of the general formula of the aforementioned WO 02/12242, herewith incorporated by reference, but are not specifically exemplified therein.

The compounds of formula (I) of the invention have asymmetric carbon atoms and may therefore exist as individual optical isomers, as racemic mixtures or as any other mixture comprising a majority of one of the two optical isomers, which are all to be intended as within the scope of the present invention.

5

Likewise, the use as an antitumor agent of all the possible isomers and their admixtures and of both the metabolites and the pharmaceutically acceptable bio-precursors (otherwise referred to as pro-drugs) of the compounds of formula (I) are also within the scope of the present invention.

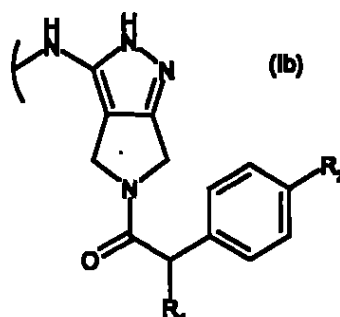
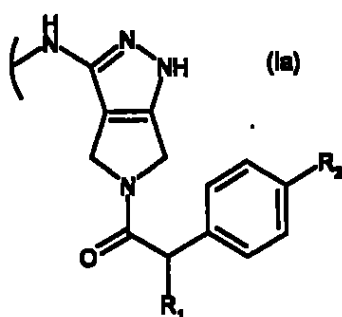
10

Prodrugs are any covalently bonded compounds, which release the active parent drug, according to formula (I), *in vivo*.

In cases when compounds may exist in tautomeric forms, each form is contemplated as being included within this invention whether existing in equilibrium or predominantly in one form.

15

As such, unless otherwise provided, when only one of the following tautomeric forms of formula (Ia) or (Ib) is indicated, the remaining one has still to be intended as comprised within the scope of the invention:



20

In the present description, unless otherwise specified, with the term straight or branched C₁-C₂ or C₁-C₄ alkyl we intend any of the groups such as, for instance, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tert-butyl and sec-butyl.

25

With the term straight or branched C₁-C₂ alkoxy we intend any of the groups such as, for instance, methoxy, ethoxy, n-propoxy and isopropoxy.

With the term halogen atom we intend a fluorine, chlorine, bromine or iodine atom.

With the term C_3-C_6 cycloalkyl we intend any group such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl or cyclohexyl.

- 5 Clearly, depending upon the nature of the X group, this same heterocycle being linked to the phenylene moiety of the compounds of formula (I) may represent a piperidino, 4-fluoropiperidino, piperazino, 4-alkyl-piperazino, 4-cycloalkyl-piperazino or morpholino ring.

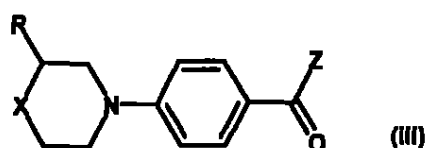
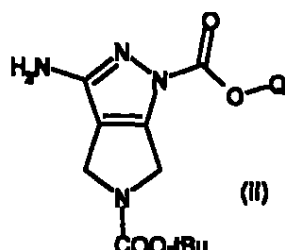
- 10 Pharmaceutically acceptable salts of the compounds of formula (I) include the acid addition salts with inorganic or organic acids such as, for instance, nitric, hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, perchloric, phosphoric, acetic, trifluoroacetic propionic, glycolic, lactic, oxalic, malonic, malic, maleic, tartaric, citric, benzoic, cinnamic, mandelic, methanesulphonic, isethionic and salicylic acid.

- 15 A preferred class of compounds of the invention is represented by the derivatives of formula (I) wherein R is hydrogen or methyl; R_1 is selected from hydroxy, methyl or methoxy; R_2 is a hydrogen or fluorine atom; X is selected from methylene, fluoromethylene, -O- or -NR', wherein R' is as above reported.

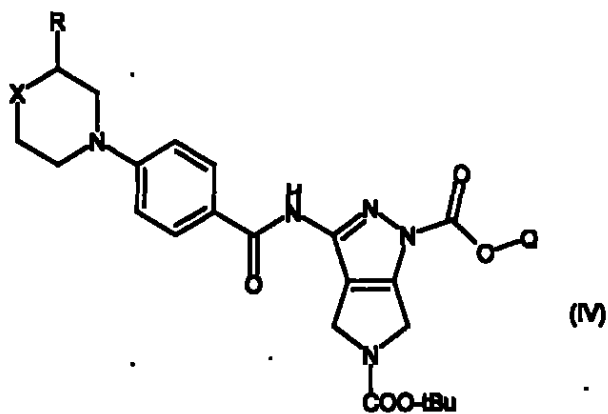
- 20 For a reference to any specific compound of formula (I) of the invention, optionally in the form of a pharmaceutically acceptable salt, see the experimental section and claims.

- As formerly indicated, a further object of the present invention is represented by the process for preparing the compounds of formula (I) and the pharmaceutically acceptable salts thereof,
25 which process comprises:

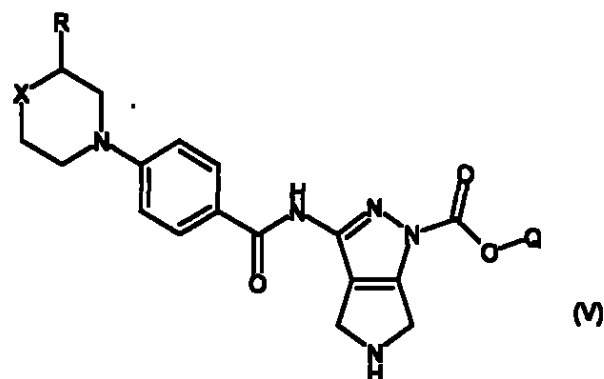
a) reacting a compound of formula (II) with a compound of formula (III)



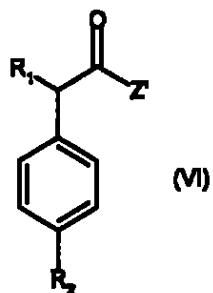
wherein R and X are as above defined, Q is a lower alkyl group, t-Bu represents tert-butyl and Z is hydroxy or a suitable leaving group, so as to obtain a compound of formula (IV)



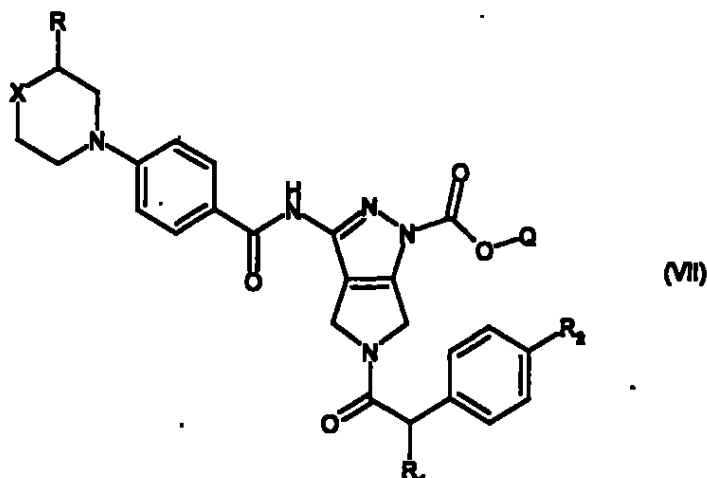
- 5 b) reacting the compound of formula (IV) under acidic conditions so as to obtain a compound of formula (V)



- c) reacting the compound of formula (V) with a compound of formula (VI)



wherein R_1 and R_2 are as above defined and Z' represents hydroxy or a suitable leaving group, so as to obtain a compound of formula (VII)



- d) reacting the compound of formula (VI) under basic conditions so as to obtain the corresponding compound of formula (I) and, if desired, converting it into a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The above process is an analogy process, which can be carried out by working according to very well-known operative conditions.

10

According to step (a) of the process, the reaction between the compounds of formula (II) and (III) can be carried out in a variety of ways, according to conventional methods for acylating amino derivatives. As an example, the compound of formula (II) may be reacted with an acyl chloride of formula (III) wherein Z represents, as a suitable leaving group, a chlorine atom.

15

Preferably, this reaction is carried out at a temperature ranging from room temperature to about 60°C, in a suitable solvent such as, for instance, tetrahydrofuran or dichloromethane, and in the presence of a proton scavenger such as triethylamine or diisopropylethylamine.

Within the compounds of formula (II) Q represents a lower alkyl group, for instance a C_1 - C_4 alkyl group, more preferably methyl or ethyl.

20

According to step (b) of the process, the compound of formula (IV) is easily deprotected at the piperidine nitrogen atom, by acidic treatment.

5 This reaction can be conveniently carried out in the presence of a mineral or organic acid such as, for instance, hydrochloric, trifluoroacetic or methanesulfonic acid, in a suitable solvent such as dichloromethane, 1,4-dioxane, a lower alcohol (e.g. methanol or ethanol), at a temperature ranging from room temperature to about 40°C and for a time varying from about 1 hour to about 48 hours.

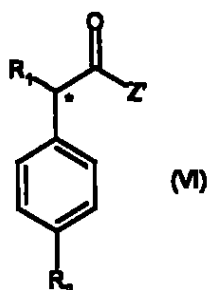
10 The compound of formula (V) thus obtained is further reacted, according to step (c) of the process, with a compound of formula (VI). From the above it is clear to the skilled person that also this acylation reaction may be accomplished in a variety of ways and operative conditions, which are widely known in the art for the preparation of carboxamides.

15 The reaction between a compound of formula (V) and a carboxylic acid of formula (VI) wherein Z' is hydroxy can be carried out in the presence of a coupling agent such as, for instance, carbodilimide, i.e. 1,3-dicyclohexylcarbodilimide, 1,3-diisopropylcarbodilimide, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodilimide, N-cyclohexylcarbodilimide-N'-propyloxymethyl polystyrene or N-cyclohexylcarbodilimide-N'-methyl polystyrene, in a suitable solvent such as, 20 for instance, dichloromethane, chloroform, tetrahydrofuran, diethyl ether, 1,4-dioxane, acetonitrile, toluene, or N,N-dimethylformamide at a temperature ranging from about -10°C to reflux for a suitable time, i.e. from about 30 minutes to about 96 hours. The said reaction is optionally carried out in the presence of a suitable catalyst, for instance 4-dimethylaminopyridine, or in the presence of a further coupling reagent such as N- 25 hydroxybenzotriazole.

The reaction between a compound of formula (V) and a compound of formula (VI) can be also carried out, for example, through a mixed anhydride method, by using an alkyl chloroformate, such as ethyl, iso-butyl, or iso-propyl chloroformate, in the presence of a tertiary base, such as 30 triethylamine, N,N-diisopropylethylamine or pyridine, in a suitable solvent such as, for instance, toluene, dichloromethane, chloroform, tetrahydrofuran, acetonitrile, diethyl ether, 1,4-dioxane, or N,N-dimethylformamide, at a temperature ranging from about -30°C to room temperature.

The reaction between a compound of formula (V) and a carboxylic derivative of formula (VI) wherein Z' is a suitable leaving group can be carried out in the presence of a tertiary base such as triethylamine, N,N-dialcpropylethylamine or pyridine, in a suitable solvent, such as toluene, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, tetrahydrofuran, acetonitrile, or N,N-dimethylformamide, at a temperature ranging from about -10°C to reflux.

The compounds of formula (VI) are characterized by the presence of an asymmetric carbon atom being linked to R₁ and presently noted with an asterisk



Hence, the compounds of formula (VI) may be either in the form of single enantiomers or as mixtures thereof, also comprehensive of racemic mixtures.

Clearly, depending upon the nature of the compound of formula (VI) being used in the process of the invention, corresponding compounds of formula (VII) having a properly defined stereochemistry at this same carbon atom could be thus obtained.

According to a preferred embodiment of the invention, step (c) is carried out by reacting a suitable compound of formula (VI), which is in a given enantiomeric form.

Likewise, if racemic mixtures of the compound of formula (VI) are employed and whenever final compounds of formula (I) in optical pure form are desired, optical resolution of the intermediate compound of formula (VII) or, alternatively, of the final compound of formula (I) will be required, by working according to conventional means. Just as an example, conventional techniques for racemate resolution include, for instance, partitioned crystallization of diastereoisomeric salt derivatives or preparative chiral HPLC.

Finally, according to step (d) of the process, the compound of formula (VII) is deprotected at the pyrazole nitrogen atom by working according to conventional methods enabling, for instance, the selective hydrolysis of the carbamate group.

5 As an example, this reaction may be carried out under basic conditions, for instance in the presence of sodium, potassium or lithium hydroxide, or a tertiary amine such as triethylamine, and in a suitable solvent such as N,N-dimethylformamide, methanol, ethanol, tetrahydrofuran, water and mixtures thereof. Typically, the reaction is carried out at temperatures ranging from room temperature to about 80°C and for a time varying from about 30 minutes to about 96
10 hours.

Finally, pharmaceutically acceptable salts of the compounds of formula (I) or, alternatively, the free compounds from their salts thereof may be all obtained according to conventional methods.

15

The starting material of the process of the invention are known or easily prepared according to known methods.

As an example, the preparation of the compound of formula (II) wherein Q represents ethyl is disclosed in the aforementioned international patent application WO 02/12242 (see, in particular, example 28 at page 249; this same compound is therein named as 3-amino-4,8-
20 dihydro-pyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylic acid 5-tert-butyl ester 1-ethyl ester).

By working in an analogous way, additional compounds of formula (II) wherein Q represents a
25 lower alkyl group other than ethyl can be thus prepared as well.

The compounds of formula (III) and (VI), for instance those wherein Z and Z' represent a halogen atom, e.g. a chlorine atom, are either known or can be easily obtained from the corresponding known carboxylic acids, by working according to conventional methods.

30

Likewise, it is also clear to the person skilled in the art that if a compound of formula (I), prepared according to the above process comprehensive of any variant thereof, is obtained as an admixture of isomers, their separation into the single isomers of formula (I), carried out according to conventional techniques, is still within the scope of the present invention.

PHARMACOLOGY

The compounds of formula (I) are active as protein kinase inhibitors, more particularly as Aurora kinases inhibitors and are therefore useful, for instance, to restrict the unregulated proliferation of tumor cells.

5

In therapy, they may be used in the treatment of various tumors, such as those formerly reported, as well as in the treatment of other cell proliferative disorders such as psoriasis, vascular smooth cell proliferation associated with atherosclerosis and post-surgical stenosis and restenosis.

10

The inhibiting activity and the potency of selected compounds is determined through a method of assay based on the use of the SPA technology (Amersham Pharmacia Biotech).

The assay consists of the transfer of radioactivity labelled phosphate moiety by the kinase to a biotinylated substrate. The resulting ^{32}P -labelled biotinylated product is allowed to bind to streptavidin-coated SPA beads (biotin capacity 130 pmol/mg), and light emitted was measured in a scintillation counter.

15

Inhibition assay of Aurora-2 activity

Kinase reaction: 8 μM biotinylated peptide (4 repeats of LRRWSLG), 10 μM ATP (0.5 μCi ^{32}P -ATP), 7.5 ng Aurora 2, inhibitor in a final volume of 30 μl buffer (HEPES 50 mM pH 7.0, MgCl_2 10 mM, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, 3 μM orthovanadate) were added to each well of a 96 U bottom well plate. After 60 minutes at room temperature incubation, reaction was stopped and biotinylated peptide captured by adding 100 μl of bead suspension.

20

Stratification: 100 μl of CaCl_2 5 M were added to each well and let stand 4 hour before radioactivity was counted in the Top-Count Instrument.

25

IC₅₀ determination: Inhibitors were tested at different concentrations ranging from 0.0015 to 10 μM . Experimental data were analyzed by the computer program GraphPad Prism using the four parameter logistic equation:

30

$$y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{-(\log \text{IC}_{50} - x) \cdot \text{slope}})$$

where x is the logarithm of the inhibitor concentration, y is the response; y starts at bottom and goes to top with a sigmoid shape.

KI calculation:

Experimental method: Reaction was carried out in buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.2 mg/ml BSA, 7.5 mM DTT) containing 3.7 nM enzyme, histone and ATP (constant ratio of cold/labeled ATP 1/3000). Reaction was stopped with EDTA and the substrate captured on phosphomembrane (Multiscreen 96 well plates from Millipore). After extensive washing, the multiscreen plates were read on a top counter. Control (time zero) for each ATP and histone concentrations was measured.

Experimental design: Reaction velocities are measured at four ATP, substrate (histone) and inhibitor concentrations. An 80-point concentration matrix was designed around the respective ATP and substrate K_m values, and the inhibitor IC₅₀ values (0.3, 1, 3, 9 fold the K_m or IC₅₀ values). A preliminary time course experiment in the absence of inhibitor and at the different ATP and substrate concentrations allows the selection of a single endpoint time (10 min) in the linear range of the reaction for the KI determination experiment.

Kinetic parameter estimates: Kinetic parameters were estimated by simultaneous nonlinear least-square regression using [Eq.1] (competitive inhibitor respect to ATP, random mechanism) using the complete data set (80 points):

$$v = \frac{V_m \cdot A \cdot B}{\alpha \cdot K_a \cdot K_b + \alpha \cdot K_a \cdot B + \alpha \cdot K_b \cdot A + A \cdot B + \alpha \cdot \frac{K_a}{K_i} \cdot I \cdot (K_b + \frac{B}{\beta})} \quad [\text{Eq.1}]$$

where A=[ATP], B=[Substrate], I=[inhibitor], V_m= maximum velocity, K_a, K_b, K_i the dissociation constants of ATP, substrate and inhibitor respectively. α and β the cooperativity factor between substrate and ATP binding and substrate and inhibitor binding respectively.

The compounds of the invention were further tested in vitro to assess the anti-proliferative effect onto cell cultures and the inhibitory effect on the cell cycle.

In vitro cell proliferation assay

The human colon cancer cell line HCT-116 was seeded at 5000 cells/cm² in 24 wells plate (Costar) using F12 medium (Gibco) supplemented with 10% FCS (EuroClone, Italy) 2 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin and maintained at 37°C, 5% CO₂ and 98% relative

humidity. The following day, plates were treated in duplicates with 5ul of an appropriate dilution of compounds starting from a 10 mM stock in DMSO. Two untreated control wells were included in each plate. After 72 hours of treatment, medium was withdrawn and cells detached from each well using 0.5 ml of 0.05% (w/v) Trypsin, 0.02% (w/v) EDTA (Gibco).
5 Samples were diluted with 9.5 ml of Isoton (Coulter) and counted using a Multisizer 3 cell counter (Beckman Coulter). Data were evaluated as percent of the control wells:
% of CTR = (Treated - Blank)/(Control - Blank).

IC₅₀ values were calculated by LSW/Data Analysis using Microsoft Excel sigmoidal curve
10 fitting.

In vitro cell cycle analysis

The human colon cancer cell line HCT-116 was seeded at 5000 cells/cm² in 24 wells plate (Costar) and cultured as mentioned above. Cells in their exponential phase of growth were
15 treated for 24 hours with different concentrations of compound. Also, culture medium supernatant was collected to avoid loss of detached apoptotic or mitotic cells. Thereafter, cells were washed using PBS and detached by 0.05% (w/v) trypsin, 0.02% (w/v) EDTA (Gibco). Trypsin activity was stopped using culture medium. Adherent and non-adherent cell fractions were pooled and centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. Cells were re-suspended in PBS and
20 counted using a Multisizer 3 cell counter (Beckman Coulter). For fixation, ethanol was added (70 %, v/v) and cells were kept at -20°C overnight.

One million fixed cells were centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes and washed with PBS and subsequently stained for 1 hour at room temperature in the dark by adding 200 µl 25 µg/ml propidium iodide (Sigma) and 15 µg/ml RNase A (Sigma), 0.001% (v/v) Nonidet P40 (Sigma)
25 in sodium citrate (0.1% w/v, pH 7.5). Samples were analyzed by flow cytometry at 488 nm excitation (FACSCalibur, Beckton Dickinson) using Cell Quest 3.0 software (Beckton Dickinson). Typically 10000 events (activating doubles discriminate module DDM and gating only single cells) were collected and cell cycle profiles were recorded using CellQuest (Verity Software). Cell Cycle distribution of the population was calculated using a modified model in
30 Modfit 3.1 software (Verity Software) and expressed in % G0/G1, S, G2/M and polyploidy.

Given the above assays, the compounds of formula (I) of the invention resulted to possess a remarkable protein kinase inhibitory activity, e.g. Aurora-2 inhibitory activity. See, as an

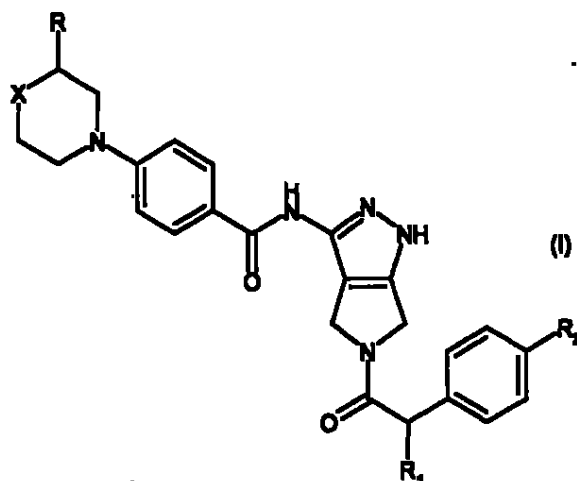
example, the following table I reporting the experimental data of four representative compounds of the invention being tested as Aurora-2 kinase inhibitors (IC_{50} nM), for their cell antiproliferative effect (IC_{50} nM), and for their capability to exert cell cycle blocking and induce polyploidy (% of G2/M + polyploidy at 200 nM).

5

Interestingly, these same compounds were tested in comparison to a structurally very close prior art compound, herewith defined as Reference compound, which is specifically disclosed in the aforementioned WO 02/12242 - see page 180, lines 5-7 of the same; the Reference compound was therein named as N-(5-phenylacetyl-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl)-4-

10

(4-methylpiperazino)benzamide.



Reference Compound ($R = R_1 = R_2 = H$; $X = NMe$)

N-[5-phenylacetyl-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazino)benzamide;

15 Compound (I) ($R = R_2 = H$; $R_1 = OMe$; $X = NMe$)

N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazino-1-yl)benzamide;

Compound (11) ($R = R_2 = H$; $R_1 = Me$; $X = NMe$)

20 N-[5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazino-1-yl)benzamide;

Compound (8) ($R = R_2 = H$; $R_1 = OMe$; $X = CH_2$)

N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-piperidin-1-ylbenzamide;

5 Compound (5) ($R = Me$; $R_1 = OMe$; $R_2 = H$; $X = NMe$)

4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)-N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]benzamide.

Table I

Compound	Aurora-2 Inhibition IC_{50} (nM)	Cell Antiproliferation IC_{50} (nM)	Cell Cycle block (% G2/M + polyploidy at 200 nM)
Reference compound	140	220	33
none	—	—	19
(1)	16	31	90
(11)	83	17	90
(8)	37	30	90
(5)	18	50	90

10 Surprisingly, the Aurora-2 inhibitory activity of the compounds of the invention resulted to be constantly and markedly superior than that of the Reference compound.

In addition, those same compounds resulted to possess a cell antiproliferative effect together with the capability to block the cell cycle and induce polyploidy, significantly superior than that
15 of the Reference compound being tested in the same conditions.

From all of the above, the novel compounds of formula (I) of the invention appear to be endowed with a biological profile, considered as a whole, which is unexpectedly superior than that of the closest prior art of WO 02/12242 and, hence, are particularly advantageous. In
20 therapy, against proliferative disorders associated with an altered Aurora-2 kinase activity.

The compounds of the present invention can be administered either as single agents or, alternatively, in combination with known anticancer treatments such as radiation therapy or

chemotherapy regimen in combination with cytostatic or cytotoxic agents, antibiotic-type agents, alkylating agents, antimetabolite agents, hormonal agents, immunological agents, interferon-type agents, cyclooxygenase inhibitors (e.g. COX-2 inhibitors), matrix metalloproteinase inhibitors, telomerase inhibitors, tyrosine kinase inhibitors, anti-growth
5 factor receptor agents, anti-HER agents, anti-EGFR agents, anti-angiogenesis agents (e.g. angiogenesis inhibitors), farnesyl transferase inhibitors, ras-raf signal transduction pathway inhibitors, cell cycle inhibitors, other cdks inhibitors, tubulin binding agents, topoisomerase I inhibitors, topoisomerase II inhibitors, and the like.

10 If formulated as a fixed dose, such combination products employ the compounds of this invention within the dosage range described below and the other pharmaceutically active agent within the approved dosage range.

Compounds of formula (I) may be used sequentially with known anticancer agents when a
15 combination formulation is inappropriate.

The compounds of formula (I) of the present invention, suitable for administration to a mammal, e.g., to humans, can be administered by the usual routes and the dosage level depends upon the age, weight, conditions of the patient and administration route.

20 For example, a suitable dosage adopted for oral administration of a compound of formula (I) may range from about 10 to about 500 mg per dose, from 1 to 5 times daily. The compounds of the invention can be administered in a variety of dosage forms, e.g., orally, in the form tablets, capsules, sugar or film coated tablets, liquid solutions or suspensions; rectally in the
25 form suppositories; parenterally, e.g., intramuscularly, or through intravenous and/or intrathecal and/or intraspinal injection or infusion.

The present invention also includes pharmaceutical compositions comprising a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof in association with a pharmaceutically
30 acceptable excipient, which may be a carrier or a diluent.

The pharmaceutical compositions containing the compounds of the invention are usually prepared following conventional methods and are administered in a suitable pharmaceutical form.

For example, the solid oral forms may contain, together with the active compound, diluents, e.g., lactose, dextrose saccharose, sucrose, cellulose, corn starch or potato starch; lubricants, e.g., silica, talc, stearic acid, magnesium or calcium stearate, and/or polyethylene glycols; binding agents, e.g., starches, arabic gum, gelatine methylcellulose, carboxymethylcellulose or polyvinyl pyrrolidone; disintegrating agents, e.g., starch, alginic acid, alginates or sodium starch glycolate; effervescent mixtures; dyestuffs; sweeteners; wetting agents such as lecithin, polysorbates, laurylsulphates; and, in general, non-toxic and pharmacologically inactive substances used in pharmaceutical formulations. These pharmaceutical preparations may be manufactured in known manner, for example, by means of mixing, granulating, tableting, sugar-coating, or film-coating processes.

The liquid dispersions for oral administration may be, e.g., syrups, emulsions and suspensions.

As an example, the syrups may contain, as carrier, saccharose or saccharose with glycerine and/or mannitol and sorbitol.

The suspensions and the emulsions may contain, as examples of carriers, natural gum, agar, sodium alginate, pectin, methylcellulose, carboxymethylcellulose, or polyvinyl alcohol.

The suspension or solutions for intramuscular injections may contain, together with the active compound, a pharmaceutically acceptable carrier, e.g., sterile water, olive oil, ethyl oleate, glycols, e.g., propylene glycol and, if desired, a suitable amount of lidocaine hydrochloride. The solutions for intravenous injections or infusions may contain, as a carrier, sterile water or preferably they may be in the form of sterile, aqueous, isotonic, saline solutions or they may contain propylene glycol as a carrier.

The suppositories may contain, together with the active compound, a pharmaceutically acceptable carrier, e.g., cocoa butter, polyethylene glycol, a polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester surfactant or lecithin.

With the aim to better illustrate the present invention, without posing any limitation to it, the following examples are now given.

EXAMPLES

General Methods

Flash chromatography was performed on silica gel (Merck grade 9385, 60Å). HPLC/MS was performed on a Waters X Terra RP 18 (4.6 x 50 mm, 3.5 µm) column using a Waters 2790 HPLC system equipped with a 996 Waters PDA detector and a Micromass mod. ZQ single quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray (ESI) ion source. Mobile phase A was ammonium acetate 5 mM buffer (pH 5.5 with acetic acid / acetonitrile 95:5), and Mobile phase B was H₂O / acetonitrile (5:95). Gradient from 10 to 90% B in 8 minutes, hold 90% B 2 min. UV detection at 220 nm and 254 nm. Flow rate 1 ml/min. Injection volume 10 µl. Full scan, mass range from 100 to 800 amu. Capillary voltage was 2.5 KV; Source temp. was 120°C; Cone was 10 V. Retention Times (HPLC r.t.) are given in minutes at 220 nm or 254 nm. Mass are given as m/z ratio. ¹H-NMR spectroscopy was performed on a Mercury VX 400 operating at 400.45 MHz equipped with a 5mm double resonance probe (¹H {¹⁵N-31P} ID_PFG Varian).

Example 1

Preparation of 5-tert-butyl 1-ethyl 3-amino-4,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate

A solution of ethyl chlorocarbonate (8.9 ml, 93 mmol) in tetrahydrofuran (THF, 250 ml) was slowly added to a mixture of tert-butyl 3-amino-4,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-5(1H)-carboxylate (20 g, 89 mmol) and diisopropylethylamine (DIEA, 92 ml, 528 mmol) in THF (500 ml) at 0-5°C. The reaction was kept at the same temperature for two hours then allowed to reach room temperature and stirred overnight. The obtained mixture was evaporated to dryness under vacuum, and the resulting residue extracted with ethyl acetate (AcOEt) and water. The organic layer was separated, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The mixture was purified by flash-chromatography (eluent: ethyl acetate/cyclohexane 4/6 to 7/3) to give 19 g of the title compound as a white solid. [M+H]⁺ 297

Example 2

Preparation of 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[(4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoyl)amino]-4,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate

Oxalyl chloride (23.2 ml, 295 mmol) was added to a suspension of 4-(4-methyl-1-piperazinyl)-benzoic acid (11.7 g, 53 mmol) in dichloromethane (DCM, 320 ml) and dimethylformamide

(DMF, 0.52 ml). After refluxing the mixture for 6.5 hours, volatiles were carefully removed under reduced pressure (taking up the residue three times with toluene).

5 The resulting 4-methylpiperazino-benzoyl chloride dihydrochloride was added portionwise to a solution of 5-tert-butyl 1-ethyl 3-amino-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate (13.1 g, 44.3 mmol) in dry THF (820 ml) and DIEA (54.4 ml, 0.32 mol) under stirring at room temperature. The resulting suspension was stirred 16 hours at room temperature and 1 hour at 40 °C.

10 After solvent removal under reduced pressure, the residue was taken up with AcOEt (800 ml) and the organic layer washed with aqueous sodium carbonate (200 ml), brine, (200 ml) and dried over sodium sulfate.

15 Solvent was evaporated, and the residue was triturated with a mixture of diethyl ether (Et₂O, 135 ml) and AcOEt (15 ml), filtered, dried under vacuum at 40°C to give 20 g of the title compound as a white powder [M+H]⁺ 499.

20 By operating in an analogous way and by reacting 5-tert-butyl 1-ethyl 3-amino-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate with the appropriate acyl chloride derivative, the following compounds were prepared:

- 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; [M+H]⁺ 513.
- 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-
25 (5)c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; [M+H]⁺ 527.
- 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; [M+H]⁺ 625.
- 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; [M+H]⁺ 513.
- 30 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-piperidin-1-yl)benzoyl]amino]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; [M+H]⁺ 484.
- 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-fluoropiperidin-1-yl)benzoyl]amino]-4,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; [M+H]⁺ 502.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-[(4-morpholin-4-ylbenzoyl)amino]-4,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; $[M+H]^+$ 488.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-4,8-dihydropyrrolo[3,4-(5)c]pyrazole-1,5-dicarboxylate; $[M+H]^+$ 541.

5

Example 3

Preparation of ethyl 3-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride

10 A 4N solution of hydrochloric acid in dioxane (122 ml, 488 mmol) was added dropwise to a stirred solution of 5-tert-butyl 1-ethyl 3-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-4,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1,5-dicarboxylate (18.5 g, 39.2 mmol), as prepared in Example 2, in dry DCM (240 ml); precipitation of a white solid occurred almost immediately. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 hours; after dilution with Et₂O (100 ml), the solid was filtered, extensively washed with Et₂O, and dried under vacuum at 50°C to
15 give 20.1 g of the title compound, used in the next step without further purification. $[M+H]^+$ 399.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.4 (t, 3H); 2.8 (d, 3H); 3.2 (m, 4H); 3.5 (m, 2H); 4.1 (m, 2H); 4.4 (q, 2H); 4.6 (m, 4H); 7.1-8.0 (m, 4H); 10.3 (bs, 2H); 10.7 (bs, 1H); 11.4 (s, 1H).

20

By operating as above reported and by starting from the suitable intermediate, the following compounds were analogously prepared:

25 ethyl 3-[[4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; $[M+H]^+$ 413.

ethyl 3-[[4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; $[M+H]^+$ 427.

ethyl 3-[[4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; $[M+H]^+$ 425.

30 ethyl 3-[[4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; $[M+H]^+$ 413.

ethyl 3-[[4-(4-piperidin-1-ylbenzoyl)amino]-5,8-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; $[M+H]^+$ 384.

ethyl 3-[[4-(4-fluoropiperidin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; [M+H]⁺ 402.

ethyl 3-[[4-(4-morfolin-4-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; [M+H]⁺ 386.

5 ethyl 3-[[4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride; [M+H]⁺ 441.

Example 4

Preparation of ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate

Oxalyl chloride (10.12 ml, 116 mmol) was added to a solution of R-(-)-α-methoxyphenylacetic acid (1.91 g, 11.5 mmol) in DCM (90 ml) and DMF (0.50 ml). After stirring the mixture at room temperature for 16 hours, volatiles were carefully removed under reduced pressure.

15 A solution of the resulting R-(-)-α-methoxyphenylacetyl chloride in DCM (20 ml) was added dropwise to a solution of ethyl 3-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate trihydrochloride (4.5 g, 8.9 mmol) in DCM (400 ml) and DIEA (11.8 ml, 89 mmol) under stirring at room temperature. The resulting solution was stirred for 20 hours at room temperature.

20 The reaction mixture was then washed with aqueous sodium carbonate (200 ml), brine, (200 ml) and dried over sodium sulfate. Solvent was evaporated, and the residue was triturated with a mixture of Et₂O (100 ml) and AcOEt (10 ml), filtered, and dried under vacuum at 40°C to give 3.94 g of the title compound as a white powder used in the following step without further purification. [M+H]⁺ 547;

25 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.3 (t, 3H); 2.3 (d, 3H); 2.6 (m, 4H); 3.3 – 3.4 (m, 7H); 4.3 (q, 2H); 4.6 – 4.8 (m, 4H); 5.1 (d, 1H) 7.0 – 8.0 (m, 8H); 11.1 (d, 1H).

30 By operating as above reported and by starting from the suitable acyl chloride derivative, the following compounds were analogously prepared:

ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 561.

- ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 576.
- ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 573.
- 5 ethyl 3-[[4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 581.
- ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[(4-piperidin-1-ylbenzoyl)amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 532.
- ethyl 3-[[4-(4-fluoropiperidin-1-yl)benzoyl]amino]-5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 550.
- 10 ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[(4-morpholin-4-ylbenzoyl)amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 534.
- ethyl 3-[[4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 589.
- 15 ethyl 5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 545.
- ethyl 5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 558.
- ethyl 5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 557.
- 20 ethyl 3-[[4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 545.
- ethyl 5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-3-[(4-piperidin-1-ylbenzoyl)amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 516.
- 25 ethyl 3-[[4-(4-fluoropiperidin-1-yl)benzoyl]amino]-5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 534.
- ethyl 5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-3-[(4-morpholin-4-ylbenzoyl)amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 518.
- ethyl 3-[[4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 573.
- 30 ethyl 5-[(2R)-2-hydroxy-2-phenylethanoyl]-3-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoyl]amino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate; [M+H]⁺ 533.

Example 5

Preparation of N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide (1)

- 5 A solution of ethyl 5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-3-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzoylamino]-5,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazole-1(4H)-carboxylate (3.94 g, 7.2 mmol) in methanol (MeOH, 130 ml) and triethylamine (Et₃N, 13 ml) was stirred at room temperature for 16 hours (some precipitation occurred). The solid was separated and washed with Et₂O, to give 1.6 g of the title compound. Solution was evaporated up to few milliliters, and a second
10 fraction of solid product was separated (1.62 g). The two fractions were joined and analyzed by LC-MS (purity around 90% 254 and 220 nm). After chromatographic purification (short silica gel column, DCM/MeOH 45:5) 2.83 g (83%) of the title compound were obtained as a white solid. M.p 289°C; [M+H]⁺ 476;
1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 2.21 (s, 3H); 2.43 (m, 4H); 3.29 (m, 7H); 4.20 - 4.90 (m, 4H);
15 5.09 (s, 1H) 6.80-8.00 (m, 9H); 10.6 (br, 1H); 12.09 (br, 1H).

By operating in an analogous way, through basic hydrolysis of the compounds of example 4, the following compounds were prepared:

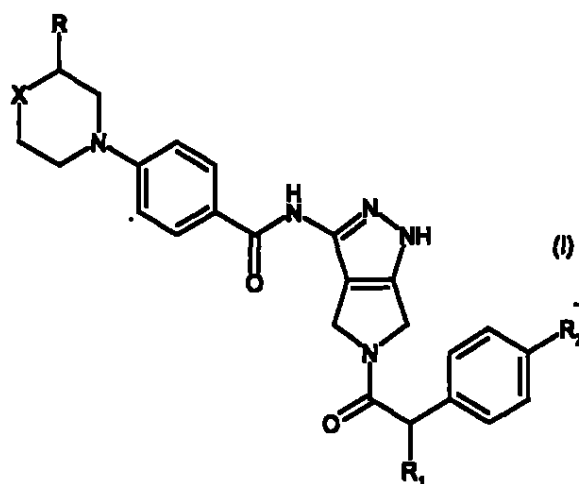
- 20 (2) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 489;
1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.1 (t, 3H); 2.3 - 2.7 (m, 6H); 3.2 - 3.4 (m, 7H); 4.3-6.0 (m, 4H); 5.1 (d, 1H) 6.9 - 8.0 (m, 9H); 10.6 (bs, 1H); 12.1 (br, 1H).
- 25 (3) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 503;
1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.3 - 1.3 (dd, 6H); 3.3 - 3.4 (m, 9H); 4.6 - 4.9 (m, 4H); 5.1 (d, 1H); 7.0 - 8.0 (m, 9H); 10.7 (bs, 1H); 12.3 (bs, 1H).
- 30 (4) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 501;
1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 0.3 - 0.5 (m, 4H); 3.2 - 3.4 (m, 7H); 3.2 - 5.0 (m, 4H); 5.1 (d, 1H); 6.8 - 8.2 (m, 9H); 10.5 - 10.7 (br, 1H); 12.0 - 12.4 (br, 1H).

- (6) 4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)-N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]benzamide; [M+H]⁺ 489;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.0 – 1.1 (m, 3H); 2.24 (s, 3H); 3.3 – 3.5 (m, 7H); 4.3 – 5.0 (m, 4H); 5.1 (d, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.6 (bs, 1H); 11.9 – 12.6 (br, 1H).
- 5 (8) N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-piperidin-1-ylbenzamide; [M+H]⁺ 480;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.5 – 1.7 (m, 6H); 3.2 – 3.4 (m, 7H); 4.3 – 4.9 (m, 4H); 5.1 (d, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H).
- 10 (7) 4-(4-fluoropiperidin-1-yl)-N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]benzamide; [M+H]⁺ 478;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.85 – 2.1 (m, 4H); 3.15 – 3.8 (m, 7H); 4.35 – 5.0 (m, 5H); 5.1 (d, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H).
- 15 (8) N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-morpholin-4-ylbenzamide; [M+H]⁺ 482;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 3.15 – 3.5 (m, 7H); 3.7 – 3.8 (m, 4H); 4.3 – 4.9 (m, 4H); 5.1 (d, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H).
- 20 (9) 4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)-N-[5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]benzamide; [M+H]⁺ 517.
- (10) N-[5-[(2R)-2-hydroxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 481;
 25 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 2.3 (s, 3H); 2.45 – 2.65 (m, 4H); 3.2 – 3.4 (m, 4H); 4.1 – 4.9 (m, 4H); 5.09 (d, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H); 11.5 – 12.9 (br, 1H).
- (11) N-[5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 459;
 30 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.33 (d, 3H); 2.21 (s, 3H); 3.85 – 5.0 (m, 5H); 4.2 – 4.9 (m, 4H); 5.1 (s, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.3 – 10.7 (br, 1H); 11.8 – 12.5 (br, 1H).

- (12) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 473;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.06 (t, 3H); 1.36 (d, 3H); 2.41 (q, 2H); 2.47 – 2.6 (m, 4H); 3.2 – 3.4 (m, 4H); 3.9 – 5.0 (m, 6H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.5 (bs, 1H); 11.9 – 12.5 (br, 1H).
- 5 (13) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 487;
- (14) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzamide; [M+H]⁺ 485;
- 10 (15) 4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-phenylpropanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide; [M+H]⁺ 473;
- 15 (16) N-{5-[(2R)-2-phenylpropanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-piperidin-1-ylbenzamide; [M+H]⁺ 444;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.37 (d, 3H); 1.6 (s, 6H); 3.2 – 3.4 (m, 4H); 3.90 – 4.05 (m, 1H); 4.1 – 4.9 (m, 4H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H).
- 20 (17) 4-(4-fluoropiperidin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide; [M+H]⁺ 482;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.37 (d, 3H); 1.65 – 2.05 (m, 4H); 3.15 – 3.6 (m, 7H); 3.2 – 3.4 (m, 4H); 3.85 – 4.07 (m, 1H); 4.1 – 5.05 (m, 6H); 5.1 (d, 1H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H).
- 25 (18) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-morpholin-4-ylbenzamide; [M+H]⁺ 446;
 1H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.37 (d, 3H); 3.2 – 3.4 (m, 4H); 3.7 – 3.85 (m, 4H); 3.9 – 4.1 (m, 1H); 4.1 – 4.95 (m, 4H); 6.9 – 8.0 (m, 9H); 10.4 – 10.7 (br, 1H).
- 30 (19) 4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-phenylpropanoyl]-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide; [M+H]⁺ 501.

CLAIMS

1. A method for treating cell proliferative disorders caused by and/or associated with an altered protein kinase activity which comprises administering to a mammal in need thereof an effective amount of a compound of formula (I)



5

wherein

R is hydrogen or methyl;

R₁ is hydroxy or a straight or branched C₁-C₃ alkyl or alkoxy group;

R₂ is a hydrogen or halogen atom;

- 10 X is a divalent group selected from methylene (-CH₂-) or fluoromethylene (-CHF-), or it is a heteroatom or heteroatomic group selected from oxygen (-O-) or nitrogen (-NR'-) wherein R' is a hydrogen atom, a straight or branched C₁-C₄ alkyl group or a C₃-C₆ cycloalkyl group; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

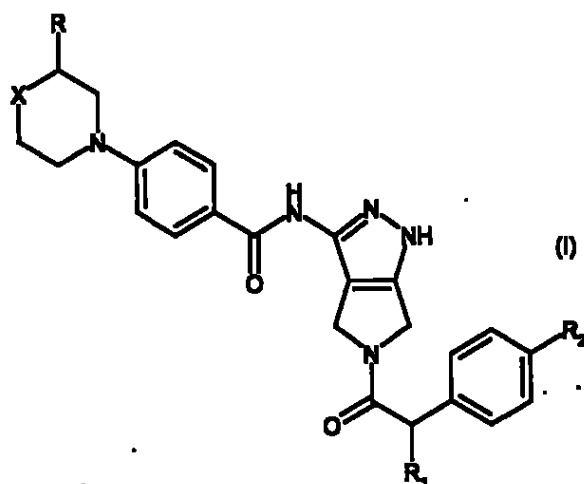
- 15 2. The method according to claim 1 for treating cell proliferative disorders caused by and/or associated with an altered Aurora kinases activity.

3. The method according to claim 2 wherein the Aurora kinase is Aurora 2.

- 20 4. The method according to claim 1 wherein the cell proliferative disorder is selected from the group consisting of cancer, Alzheimer's disease, viral infections, auto-immune diseases and neurodegenerative disorders.

- 5 6. The method according to claim 4 wherein the cancer is selected from the group consisting of carcinoma, squamous cell carcinoma, hematopoietic tumors of myeloid or lymphoid lineage, tumors of mesenchymal origin, tumors of the central and peripheral nervous system, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, keratoxanthoma, thyroid follicular cancer, and Kaposi's sarcoma.
- 10 8. The method according to claim 1 wherein the cell proliferative disorder is selected from the group consisting of benign prostate hyperplasia, familial adenomatous polyposis, neuro-fibromatosis, psoriasis, vascular smooth cell proliferation associated with atherosclerosis, pulmonary fibrosis, arthritis, glomerulonephritis and post-surgical stenosis and restenosis.
- 15 7. The method according to claim 1 further comprising subjecting the mammal in need thereof to a radiation therapy or chemotherapy regimen in combination with at least one cytostatic or cytotoxic agent.
8. The method according to claim 1 wherein the mammal in need thereof is a human.
- 20 9. A method for inhibiting Aurora 2 kinase activity which comprises contacting the said kinase with an effective amount of a compound as defined in claim 1.

10. A compound of formula (I)



wherein

- 5 R is hydrogen or methyl;
 R₁ is hydroxy or a straight or branched C₁-C₃ alkyl or alkoxy group;
 R₂ is a hydrogen or halogen atom;
 X is a divalent group selected from methylene (-CH₂-) or fluoromethylene (-CHF-), or it is a
 heteroatom or heteroatomic group selected from oxygen (-O-) or nitrogen (-NR') wherein R' is
 10 a hydrogen atom, a straight or branched C₁-C₄ alkyl group or a C₂-C₆ cycloalkyl group;
 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

11. A compound of formula (I) according to claim 10 wherein R is hydrogen or methyl; R₁
 is selected from hydroxy, methyl or methoxy; R₂ is a hydrogen or fluorine atom; X is selected
 15 from methylene, fluoromethylene, -O- or -NR', wherein R' is as defined in claim 10.

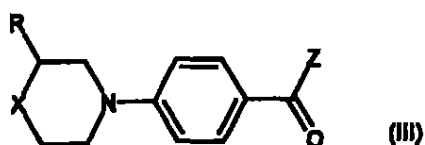
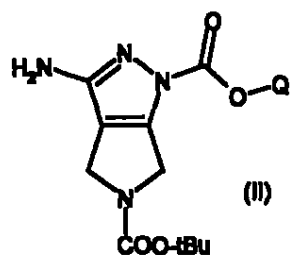
12. A compound of formula (I) according to claim 1, optionally in the form of a
 pharmaceutically acceptable salt thereof, selected from the group consisting of:

- 20 (1) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-
 4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide;
 (2) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-
 4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzamide;

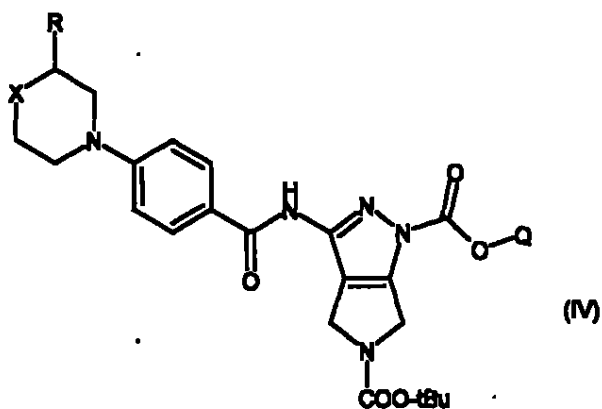
- (3) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzamide;
- (4) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzamide;
- 5 (5) 4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide;
- (6) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-piperidin-1-ylbenzamide;
- (7) 4-(4-fluoropiperidin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide;
- 10 (8) N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-morpholin-4-ylbenzamide;
- (9) 4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-methoxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide;
- 15 (10) N-{5-[(2R)-2-hydroxy-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide;
- (11) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzamide;
- (12) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzamide;
- 20 (13) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-isopropylpiperazin-1-yl)benzamide;
- (14) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-(4-cyclopropylpiperazin-1-yl)benzamide;
- 25 (15) 4-(3,4-dimethylpiperazin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-phenylpropanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide;
- (16) N-{5-[(2R)-2-phenylpropanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-piperidin-1-ylbenzamide;
- (17) 4-(4-fluoropiperidin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide;
- 30 (18) N-{5-[(2R)-2-methyl-2-phenylethanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}-4-morpholin-4-ylbenzamide;
- (19) 4-(4-tert-butylpiperazin-1-yl)-N-{5-[(2R)-2-phenylpropanoyl]-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-yl}benzamide.

13. A process for preparing the compounds of formula (I) and the pharmaceutically acceptable salts thereof, according to claim 10, which process comprises:

a) reacting a compound of formula (II) with a compound of formula (III)

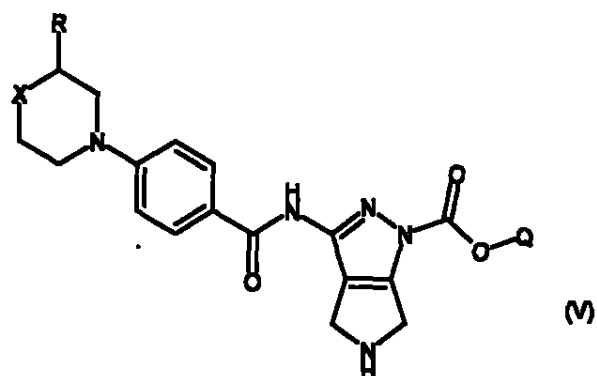


wherein R and X are as defined in claim 10, Q is a lower alkyl group, t-Bu represents tert-butyl and Z is hydroxy or a suitable leaving group, so as to obtain a compound of formula (IV)

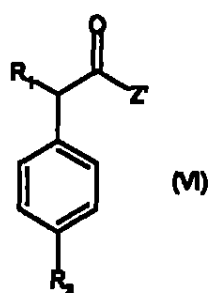


b) reacting the compound of formula (IV) under acidic conditions so as to obtain a compound of formula (V)

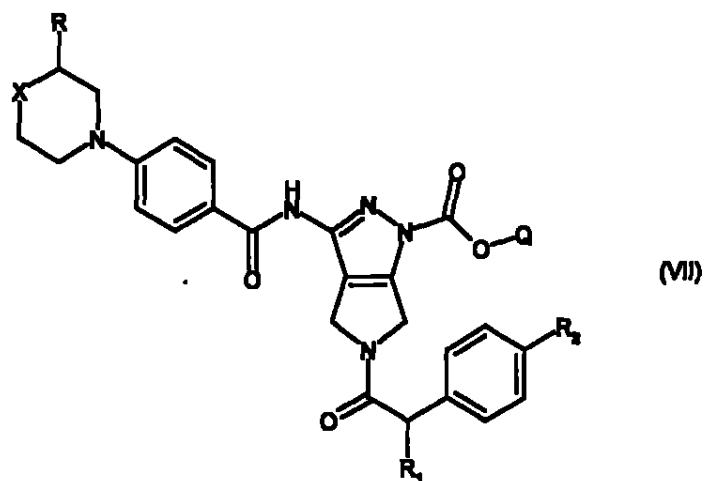
10



c) reacting the compound of formula (V) with a compound of formula (VI)



wherein R₁ and R₂ are as defined in claim 10 and Z' represents hydroxy or a suitable leaving group, so as to obtain a compound of formula (VII)



- d) reacting the compound of formula (VII) under basic conditions so as to obtain the corresponding compound of formula (I) and, if desired, converting it into a pharmaceutically acceptable salt thereof.
- 5 14. The process according to claim 13 wherein, within the compounds of formula (II), Q represents a straight or branched C₁-C₄ alkyl group.
15. The process according to claim 14 wherein Q is methyl or ethyl.
- 10 16. The process according to claim 13 wherein, within the compounds of formula (III) and (VI), Z and Z' are, each independently, hydroxy or a halogen atom.
17. The process according to claim 16 wherein the halogen atom is chlorine.
- 15 18. The process according to claim 13 wherein step (b) is carried out under acidic conditions in the presence of hydrochloric, trifluoroacetic or methanesulfonic acid.
19. The process according to claim 13 wherein step (d) is carried out under basic conditions in the presence of sodium, potassium or lithium hydroxide, or of a tertiary amine
20 such as triethylamine.
20. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, as defined in claim 10, and at least one pharmaceutically acceptable excipient, carrier and/or diluent.
- 25 21. A pharmaceutical composition according to claim 20 further comprising one or more chemotherapeutic agents.
22. A product or kit comprising a compound of formula (I) or a pharmaceutically
30 acceptable salt thereof, as defined in claim 10, or pharmaceutical compositions thereof as defined in claim 20, and one or more chemotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential use in anticancer therapy.

23. A compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, as defined in claim 10, for use as a medicament.

24. Use of a compound of formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, as
5 defined in claim 10, in the manufacture of a medicament with antitumor activity.

..... TRADUCCIÓN PÚBLICA

DERIVADOS DE PIRROLO [3,4-c]PIRAZOL ACTIVOS COMO INHIBIDORES
DE QUINASA, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN Y COMPOSICIONES
FARMACÉUTICAS QUE LOS COMPRENDEN.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud
Estadounidense Provisoria N° 60/485.814 presentada el 9 de
julio de 2003.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a derivados de pirrolo-
pirazol, a un procedimiento para su preparación, a
composiciones farmacéuticas que los comprenden, y a su uso
como agentes terapéuticos, particularmente en el tratamiento
del cáncer y desórdenes de proliferación celular.

Análisis de los Antecedentes.

El mal funcionamiento de las proteína quinasas (PKs) es el
sello de numerosas enfermedades. Una gran porción de los
oncogenes y proto-oncogenes involucrados en cánceres humanos
codifican para PKs. Las actividades potenciadas de las PKs
están también implicadas en muchas enfermedades no malignas,

tales como hiperplasia benigna de próstata, adenomatosis familiar, poliposis, neuro-fibromatosis, psoriasis, proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, glomerulonefritis y estenosis y restenosis post-quirúrgica. Las PKs están también implicadas en condiciones inflamatorias y en la multiplicación de virus y parásitos. Las PKs juegan también un rol importante en la patogénesis y desarrollo de desórdenes neurodegenerativos.

Puede verse una referencia general al mal funcionamiento de desregulación de las PKs en, por ejemplo. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999, 3, 459-465.

Entre las varias proteína quinasas conocidas en el arte como implicadas en el desarrollo de células cancerosas están las Aurora quinasas, en particular la Aurora-2.

Se encontró que la Aurora-2 se sobreexpresaba en una cantidad de diferentes tipos de tumores. El locus de su gen mapea en 20q13, una región cromosómica frecuentemente amplificada en muchos cánceres, incluyendo el de mama. [*Cancer Res.* 1999, 59(9), 2041-4] y colon.

La amplificación de 20q13 se correlaciona con una mala prognosis en pacientes con cáncer de mama nodo-negativo y la

mayor expresión de Aurora-2 es indicativa de mala prognosis y menor sobrevida en pacientes con cáncer de vejiga [*J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 94(17), 1320-9]. Para una referencia general al papel de la Aurora-2 en la función centrosoma anormal en el cáncer véase también *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, 2, 589-595.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN.

Es un objeto de la invención proveer compuestos útiles en terapia como agentes contra una gran cantidad de enfermedades causadas por y/o asociadas a una actividad desregulada de la proteína quinasa y, más particularmente, actividad de Aurora quinasas.

Es otro objeto el de proveer compuestos dotados con actividad inhibidora de la proteína quinasa y, más particularmente, actividad inhibidora de las Aurora quinasas.

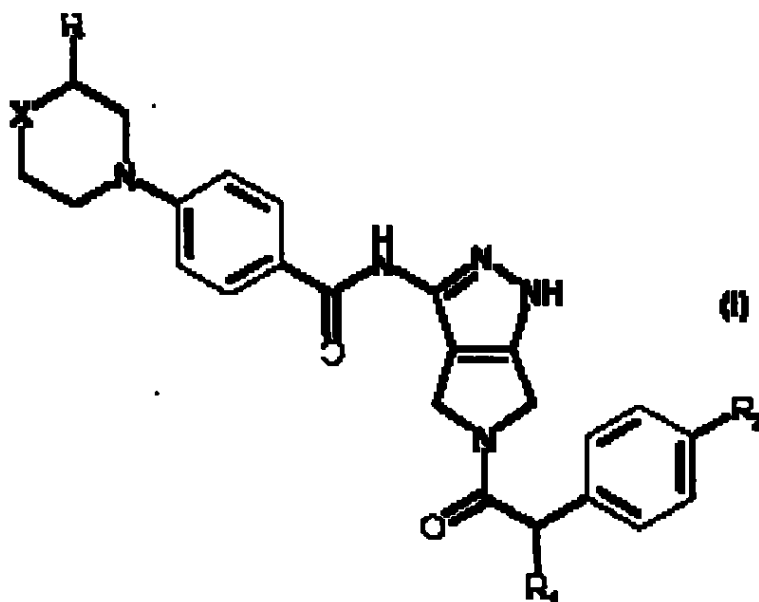
Los presentes inventores han descubierto ahora que algunos pirrolo-pirazoles y sus derivados están dotados con actividad inhibidora de la proteína quinasa, p.ej. actividad inhibidora de las Aurora quinasas.

Más específicamente, los compuestos de esta invención son útiles en el tratamiento de una variedad de cánceres que incluyen, sin limitarse a ellos: carcinoma tal como de

vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata y piel, incluyendo carcinoma de célula escamosa; tumores hematopoyéticos de linaje linfoideo, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de célula pilosa y linfoma de Burkett, tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma, tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; otros tumores incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, queratocarcinoma, cáncer folicular tiroideo y sarcoma de Kaposi.

Dado el papel clave de las PKs y Aurora quinasas en la regulación de la proliferación celular, estos pirrolo-pirazoles son también útiles en el tratamiento de una variedad de desórdenes proliferativos celulares tales como, por ejemplo, hiperplasia benigna de próstata, adenomatosis

familiar, poliposis, neuro-fibromatosis, psoriasis, proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, glomerulonefritis y estenosis y restenosis post-quirúrgica. De acuerdo con eso, en una primera forma de realización, la presente invención provee un método para tratar desórdenes proliferativos celulares causados por y/o asociados con una actividad alterada de la proteína quinasa, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I)



donde

R es hidrógeno o metilo;

R₁ es hidroxí o un grupo C₁-C₃ alquilo o alcoxi recto o ramificado;

R₂ es un átomo de hidrógeno o halógeno;

X es un grupo divalente seleccionado entre metileno (-CH₂-) o fluorometileno (-CHF-), o es un heteroátomo o grupo heteroatómico seleccionado entre oxígeno (-O-) o nitrógeno (-NR'-) donde R' es un átomo de hidrógeno, un grupo C₁-C₄ alquilo o un grupo C₁-C₆ cicloalquilo recto o ramificado; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

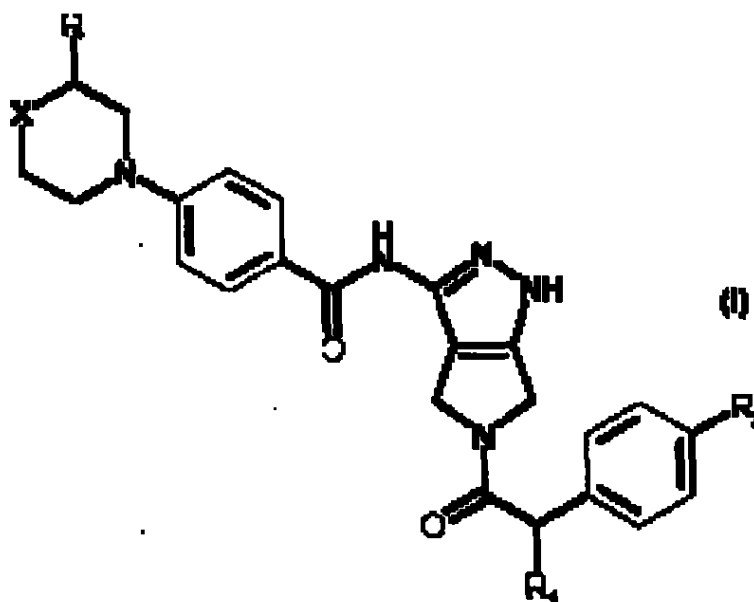
El método que antecede permite el tratamiento de desórdenes celulares proliferativos causados por y/o asociados a una actividad de Aurora quinasas alterada.

En una forma de realización preferida del método arriba descrito, el desorden proliferativo celular es cáncer. Los tipos específicos de cánceres que se pueden tratar incluyen carcinoma, carcinoma de célula escamosa, tumores hematopoyéticos de linaje mielóide o linfóide, tumores de origen mesenquimal, tumores del sistema nervioso central y periférico, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, queratoxantoma, cáncer

folicular tiroideo y sarcoma de Kaposi.

La presente invención provee también un compuesto de fórmula

(I)



donde

R es hidrógeno o metilo;

R₁ es hidroxil o un grupo C₁-C₃ alquilo o alcoxi recto o ramificado;

R₂ es un átomo de hidrógeno o halógeno;

X es un grupo divalente seleccionado entre metileno (-CH₂-) o fluorometileno (-CHF-), o es un heteroátomo o grupo heteroatómico seleccionado entre oxígeno (-O-) o nitrógeno

(-NR'-) donde R' es un átomo de hidrógeno, un grupo C₁-C₄ alquilo o un grupo C₃-C₆ cicloalquilo recto o ramificado; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La presente invención incluye también métodos para sintetizar los pirrolo-pirazoles de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables, como así también las composiciones farmacéuticas que los comprenden.

Una apreciación más completa de la invención y muchas de sus ventajas se lograrán fácilmente a medida que se la comprenda mejor por referencia a la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se conocen en el arte diversos compuestos heterocíclicos como inhibidores de la proteína quinasa.

Entre ellos, se han divulgado 3-carboxamido-pirazoles y 3-ureido-pirazoles y derivados de los mismos como inhibidores de la proteína quinasa en las solicitudes de patente internacional, WO 01/12189, WO 01/12188, WO 02/48114 y WO 02/702515, todas a nombre de la solicitante.

También se han divulgado compuestos bicíclicos fusionados que comprenden partes pirazol y que poseen actividad inhibidora de la quinasa en las WO 00/69846, WO 02/12242 como así también en la WO 03/028720 y en la solicitud aun no publicada

PCT/EP03/04862 (que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente estadounidense 60/381092 depositada el 17 de mayo de 2002), todas a nombre de la solicitante.

Además de lo que antecede, se divulgan derivados de aminofenil-piperazina o aminofenil-piperidina con actividad inhibitoria hacia las prenil transferasa proteínas en la WO 02/30927 a nombre de Pierre-Fabre Medicament.

Los compuestos de la presente invención caen dentro del alcance de la fórmula general de la mencionada WO 02/12242, incorporada a la presente a modo de referencia, pero que no están específicamente ejemplificados en esa.

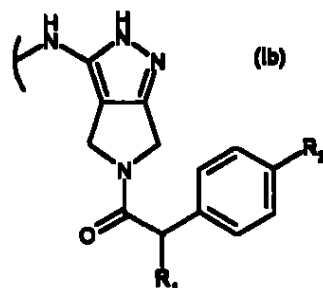
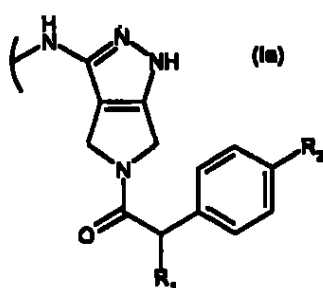
Los compuestos de fórmula (I) de la invención tienen átomos de carbono asimétricos y por lo tanto pueden existir como isómeros ópticos individuales, como mezclas racémicas o como cualquier otra mezcla que comprenda una mayoría de uno de los dos isómeros ópticos, todos los cuales se consideran incluidos en el alcance de la presente invención.

Igualmente, el uso como agente antitumoral de todos los isómeros posibles y sus mezclas y ambos metabolitos y los bio-precursores farmacéuticamente aceptables (también conocidos como pro-drogas) de los compuestos de fórmula (I) se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Las pro-drogas son cualesquiera compuestos covalentemente ligados, que liberan la droga madre activa, de acuerdo con la fórmula (I), in vivo.

En los casos en que los compuestos puedan existir en forma tautomérica, cada forma se considera incluida dentro del alcance de la invención, sea que existan en equilibrio o predominantemente en una forma.

Así, salvo provisión en contrario, cuando se indique sólo una de las siguientes formas tautoméricas de fórmula (Ia) o (Ib), la restante sigue siendo considerada incluida en el alcance de la presente invención.



En la presente descripción, salvo especificación en contrario el término alquilo C₁-C₃ o C₁-C₄ recto o ramificado se refiere a cualquiera de los grupos tales como, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, tert-butilo y sec-butilo.

El término alcoxi C₁-C₃ recto o ramificado se refiere a

cualquiera de los grupos tales como, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi e isopropoxi.

El término halógeno se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

El término ccicloalquilo C_3-C_6 se refiere a cualquier grupo tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo.

Claramente, dependiendo de la naturaleza del grupo X, este mismo heterociclo ligado a la parte fenileno de los compuestos de la fórmula (I) puede representar un anillo piperidino, 4-fluoropiperidino, piperazino, 4-alkuil-piperazino, 4-cicloalquil-piperazino o morfolino.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen las sales de adición de ácido con ácidos orgánicos o inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido nítrico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, perclórico, fosfórico, acético, trifluoroacético, propiónico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, málico, maleico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metansulfónico, isetiónico y salilífico.

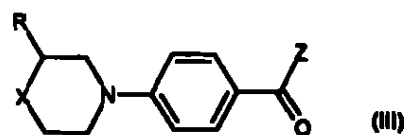
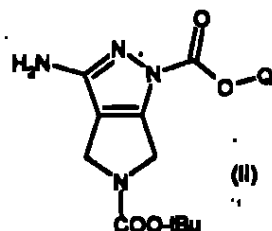
Una clase preferida de compuestos de la invención es la representada por los derivados de fórmula (I) donde R es

hidrógeno o metilo, R_1 se selecciona entre hidroxilo, metilo o metoxi, R_2 es un átomo de hidrógeno o flúor, X se selecciona entre metileno, fluormetileno, -O- o NR=, donde R= es como se expresa previamente.

Para una referencia a cualquier compuesto específico de fórmula (I) de la invención, opcionalmente en forma de sal farmacéuticamente aceptable, véanse la sección experimental y las reivindicaciones.

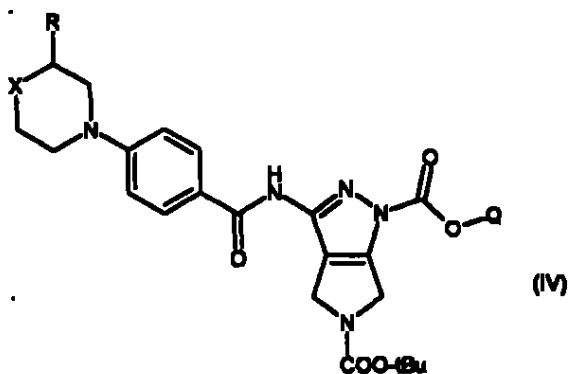
Como se indicara previamente, otro objeto de la presente invención se representa mediante el procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, procedimiento que comprende:

- a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III)

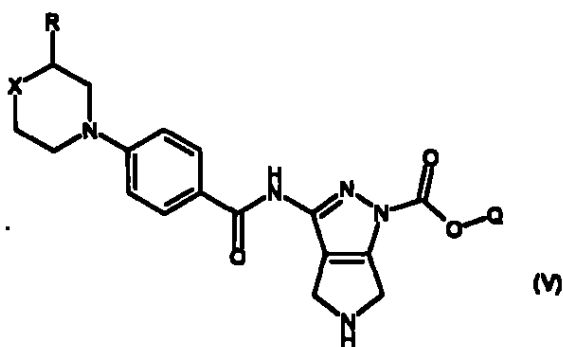


donde R y X son como se define previamente, Q es un grupo alquilo inferior, t-Bu representa tert-butilo y Z es hidroxilo o un grupo saliente adecuado, de modo de obtener un compuesto

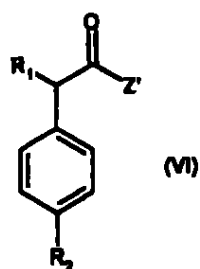
de fórmula (IV)



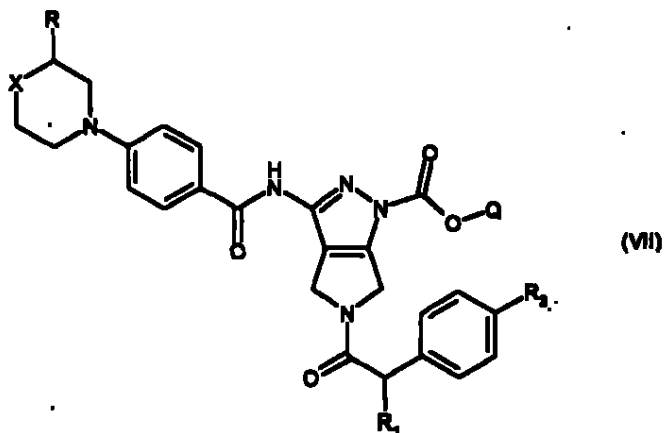
b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IV) bajo condiciones acídicas de modo de obtener un compuesto de fórmula (V) :



c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (V) con un compuesto de fórmula (VI)



donde R_1 y R_2 son como se define previamente y Z= representa hidroxil o un grupo saliente adecuado, de modo de obtener un compuesto de fórmula (VII)



d) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (VII) bajo condiciones básicas de modo de obtener el compuesto correspondiente de fórmula (I) y, si se desea, convertirlo en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El procedimiento que antecede es uno de analogía, que puede ser llevado a cabo por el operador de acuerdo con condiciones operativas muy bien conocidas.

De acuerdo con el paso (a) del procedimiento, la reacción entre los compuestos de fórmula (II) y (III) puede ser realizado en una variedad de formas, de acuerdo con métodos convencionales para acilar los derivados amino. Como ejemplo,

puede hacerse reaccionar el compuesto de fórmula (II) con un cloruro de acilo de fórmula (III) donde Z representa, como grupo saliente adecuado, un átomo de cloro.

Preferentemente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y alrededor de los 60°C, en un solvente adecuado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano o diclorometano, y en presencia de un depurador de protones tal como trietilamina o diisopropiletilamina.

Dentro de los compuestos de fórmula (II), Q representa un grupo alquilo inferior, por ejemplo un grupo alquilo C₁-C₄, más preferentemente metilo o etilo.

De acuerdo con el paso (b) del procedimiento, el compuesto de fórmula (IV) se desprotege fácilmente al átomo de pirrolidina nitrógeno, mediante tratamiento ácido.

Esta reacción puede ser convenientemente llevada a cabo en presencia de un ácido mineral u orgánico tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico, trifluoroacético o metansulfónico, en un solvente adecuado tal como diclorometano, 1,4-dioxano, un alcohol inferior, (p.ej. metanol o etanol) a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y alrededor de los 40°C y durante un

tiempo comprendido entre alrededor de 1 hora y alrededor de 48 horas.

El compuesto de fórmula (V) así obtenido se hace reaccionar posteriormente, de acuerdo con el paso (c) del procedimiento, con un compuesto de fórmula (VI). De lo que antecede resulta claro para el especialista que también esta reacción de acilación puede ser realizada en una variedad de formas y condiciones operativas, ampliamente conocidas en el arte para la preparación de carboxamidas.

La reacción entre un compuesto de fórmula (V) y un ácido carboxílico de fórmula (VI) donde Z' es hidroxilo puede ser llevada a cabo en presencia de un agente de acople tal como, por ejemplo, carbodiimida, o sea 1,3-diciclohexilcarbodiimida, 1,3-diisopropilcarbodiimida, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, N-ciclohexilcarbodiimida-N=propiloxi metil poliestireno o N-ciclohexilcarbodiimida-N=metil poliestireno, en un solvente adecuado tal como, por ejemplo, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, dietiléter, 1,4-dioxano, acetonitrilo, tolueno o N,N-dimetilformamida, a una temperatura comprendida entre alrededor de los -10°C y la de reflujo durante un tiempo adecuado, o sea entre alrededor de 30 minutos y alrededor de

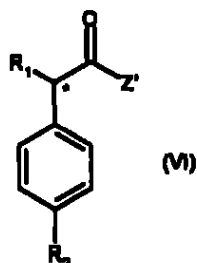
96 horas. Dicha reacción se lleva a cabo opcionalmente en presencia de un catalizador adecuado, por ejemplo 4-dimetilaminopiridina, o en presencia de otro reactivo de acople tal como N-hidroxibenzotriazol.

La reacción entre un compuesto de fórmula (V) y un compuesto de fórmula (VI) también puede ser llevada a cabo, por ejemplo, a través de un método anhidro mixto, usando un alquil cloroformato, tal como etilo, iso-butilo o iso-propilo cloroformato, en presencia de una base terciaria, tal como trietilamina, N,N-diisopropiletilamina o piridina, en un solvente adecuado tal como por ejemplo tolueno, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, dietiléter, 1,4-dioxano o N,N-dimetilformamida, a una temperatura comprendida entre alrededor de -30°C y la temperatura ambiente.

La reacción entre un compuesto de fórmula (V) y un derivado carboxílico de fórmula (VI) donde Z= es un grupo saliente adecuado puede ser llevada a cabo en presencia de una base terciaria tal como trietilamina, N,N-diisopropiletilamina o piridina, en un solvente adecuado tal como tolueno, diclorometano, cloroformo, dietiléter, tetrahidrofurano, acetonitrilo o N,N-dimetilformamida, a una temperatura

comprendida entre alrededor de -10°C y la de reflujo.

Los compuestos de fórmula (VI) se caracterizan por la presencia de un átomo de carbono asimétrico ligado a R_1 e indicados con un asterisco



Así, los compuestos de fórmula (VI) pueden ser en forma de enantiómeros simples o como mezclas de los mismos, que también comprenden mezclas racémicas.

Claramente, dependiendo de la naturaleza del compuesto de fórmula (VI) utilizado en el procedimiento de la invención, podrían obtenerse por lo tanto los correspondientes compuestos de fórmula (VII) con una estequiometría definida apropiadamente en este mismo átomo de carbono.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el paso c) se lleva a cabo haciendo reaccionar un compuesto adecuado de fórmula (VI) que se encuentra en una forma enantiomérica dada.

Similarmente, si se emplean mezclas racémicas del compuesto

de fórmula (VI) y cuando se deseen compuestos finales de fórmula (I) en forma ópticamente pura, la resolución óptica del compuesto intermediario de fórmula (VII) o, alternativamente, si se requiere del compuesto final de fórmula (I), trabajando de acuerdo con medios convencionales. Sólo como ejemplo, las técnicas convencionales para la resolución de racematos incluyen, por ejemplo, la cristalización repartida de derivados de sal diastereoisomérica o HPLC quiral preparativa. Finalmente, de acuerdo con el paso (d) del procedimiento, el compuesto de fórmula (VII) se desprotege al átomo de pirazol nitrógeno trabajando de acuerdo con métodos convencionales que permitan, por ejemplo, la hidrólisis selectiva del grupo carbamato. Como ejemplo, esta reacción puede ser llevada a cabo bajo condiciones básicas, por ejemplo en presencia de hidróxido de sodio, potasio o litio, o una amina terciaria tal como trietilamina, y en un solvente adecuado tal como N,N-dimetilformamida, metanol, etanol, tetrahidrofurano, agua y mezclas de los mismos. Típicamente, la reacción se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre la temperatura ambiente y alrededor de los 60°C y durante un tiempo que

varía entre alrededor de los 30 minutos y alrededor de las 96 horas.

Finalmente, todas las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) o, alternativamente, los compuestos libres a partir de sus sales, pueden obtenerse de acuerdo con métodos convencionales.

Los materiales de inicio del procedimiento de la invención son conocidos o se preparan fácilmente de acuerdo con métodos conocidos.

Como ejemplo, la preparación del compuesto de fórmula (II) donde Q representa etilo se divulga en la solicitud de patente internacional arriba mencionada WO 02/12242 (véase, en particular, el ejemplo 26 en la página 249, este mismo compuesto se expresa allí como ácido 3-amino-4,6-dihidropirrol[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxílico 5-tert-butiléster 1-etiléster.

Trabajando en forma similar, pueden prepararse también compuestos adicionales de fórmula (II) donde Q representa un grupo alquilo inferior que no sea etilo.

Los compuestos de fórmula (III) y (IV), por ejemplo aquellos en los que Z y Z= representan un átomo de halógeno, p.ej. un átomo de cloro, son conocidos o pueden obtenerse fácilmente a

partir de los correspondientes ácidos carboxílicos conocidos, trabajando de acuerdo con métodos convencionales.

Similarmemente, quedará claro para el experto en el arte que si un compuesto de fórmula (I), preparado de acuerdo con el mencionado procedimiento incluyendo cualquier variante del mismo, se obtiene como una mezcla de isómeros, llevando a cabo su separación en los isómeros individuales de fórmula (I) de acuerdo con técnicas convencionales, sigue estando dentro del alcance de la presente invención.

FARMACOLOGÍA

Los compuestos de fórmula (I) son activos como inhibidores de la proteína quinasa, más particularmente como inhibidores de las Aurora quinasas, y son por lo tanto útiles, por ejemplo, para restringir la proliferación no regulada de células tumorales.

En terapia, pueden emplearse para el tratamiento de diversos tumores, tales como los ya mencionados, como así también para el tratamiento de otros desórdenes proliferativos de las células, tales como psoriasis, proliferación de células lisas vasculares asociada con la aterosclerosis y estenosis y restenosis post-quirúrgica.

La actividad inhibidora y la potencia de los compuestos

seleccionados se determina a través de un método de ensayo basado en el uso de la tecnología SPA (Amersham Pharmacia Biochem). El ensayo consiste en la transferencia de la parte de fosfato radio-rotulada por la quinasa a un sustrato biotinilado. El producto ^{33}P -rotulado biotinilado resultante se deja ligar a perlas SPA recubiertas con estreptavidina (capacidad de la biotina 130 pmol/mg) y la luz emitida se midió en un contador de centelleo.

Ensayo de inhibición de la actividad de la Aurora-2

Reacción de quinasa. Se agregaron a cada cavidad de una placa de 96 cavidades con fondo en "U" 8 μm de péptido biotinilado (4 repeticiones de LRRWSLG), 10 μm de ATP (0,5 uCi P^{33} -ATP), 7,5 ng de inhibidor de Aurora-2, en un volumen final de 30 μl de buffer (HEPES 50 mM pH 7,0, MgCl_2 10 mM, 1 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 3 μM ortovanadato). Después de incubar a la temperatura ambiente durante 60 minutos, se detuvo la reacción y se capturó el péptido biotinilado agregando 100 μl de suspensión de perlas.

Estratificación. Se agregaron 100 μl de CsCl_2 5M a cada cavidad y se dejó estar durante 4 horas antes del recuento de radioactividad en el instrumento Top-Count.

Determinación IC50. Se testearon inhibidores a diferentes concentraciones comprendidas entre 0,0015 y 10 μM . Los datos experimentales se analizaron mediante el programa de computación GraphPad Prizm usando la ecuación logística de cuatro parámetros:

$y = \text{inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{-(\log \text{IC}_{50} - x) \cdot \text{pendiente}})$

donde x es el logaritmo de la concentración de inhibición, y es la respuesta; y comienza en la parte inferior y va a la parte superior con una forma sigmoidea.

Cálculo K_i :

Método experimental: La reacción se llevó a cabo en buffer (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 0,2 mg/ml BSA, 7,5 mM DTT) que contenía 3,7 nM de enzima, histona y ATP (relación constante de ATP frío/rotulado 1/1300). La reacción se detuvo con EDTA y el sustrato se capturó en fosfomembrana (placas Multiscreen de 96 cavidades Millipore). Luego de lavar a fondo, las placas Multiscreen se leyeron en un contador de mesa. Se midió el control (tiempo cero) para las concentraciones tanto de ATP como de histona.

Diseño experimental: Las velocidades de reacción se miden en cuatro concentraciones de ATP, sustrato (histona) e

inhibidor. Se diseñó una matriz de concentración de 80 puntos alrededor de los respectivos valores de ATP y sustrato Km, y los valores IC50 del inhibidor (0, 3, 1, 3, 9 veces los valores Km o IC50). Un experimento preliminar de transcurso de tiempo en ausencia de inhibidor y a diferentes concentraciones de ATP y sustrato permite la selección de un solo tiempo de punto final (10 min) en el rango lineal de la reacción para el experimento de determinación de Ki.

Estimados de parámetro cinético: Los parámetros cinéticos se estimaron por regresión del mínimo cuadrado no lineal simultáneo usando [Eq.1] (inhibidor competitivo con respecto a ATP, mecanismo aleatorio) usando el conjunto de datos completo (80 puntos):

$$v = \frac{V_m \cdot A \cdot B}{\alpha \cdot K_a \cdot K_b + \alpha \cdot K_a \cdot B + \alpha \cdot K_b \cdot A + A \cdot B + \alpha \cdot \frac{K_a}{K_i} \cdot I \cdot (K_b + \frac{B}{\beta})} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde A = [ATP], B = [Sustrato], I = [inhibidor], Vm = velocidad máxima, ka, Kb, Ki las constantes de disociación de ATP, sustrato e inhibidor respectivamente. α y β el factor de cooperatividad en la unión entre sustrato y ATP y unión entre sustrato e inhibidor respectivamente. Los compuestos de la invención se testearon además in vitro para evaluar el efecto

anti-proliferativo en cultivos de células y el efecto
inhibidor en el ciclo celular.

Ensayo de proliferación celular in vitro

La línea celular del cáncer de colon humano HCT-116 se sembró a 5000 células/cm² en placas de 24 cavidades (Costar) usando medio F12 (Gibco) suplementado con FCS 10% (EuroClone, Italia) 2 mM L-glutamina y 1% penicilina/estreptomicina manteniendo a 37°C, 5% CO₂ y 96% de humedad relativa. Al día siguiente, las placas se trataron en duplicados con 5 µl de una dilución apropiada de compuestos comenzando desde un stock de 10 mM en DMSO. Se incluyeron en cada placa dos cavidades de control sin tratar. A las 72 horas de tratamiento, se retiró el medio y las células se desprendieron de cada cavidad usando 0,5 ml de 0,05% (p/v) Tripsina, 0,02% (p/v) EDTA (Gibco). Se disolvieron las muestras con 9,5 ml de Isoton (Coulter) y se realizó el recuento usando un contador de células Multisizer 3 (Beckman Coulter). Los datos se evaluaron como porcentaje de las cavidades de control.

% CTR = (Tratada-Testigo)/Control-Testigo).

Se calcularon los valores IC₅₀ mediante LSW/Análisis Datos usando el accesorio de curva sigmoideal de Microsoft Excell.

Análisis de Ciclo celular in vitro

La línea celular del cáncer de colon humano HCT-116 se sembró a 5000 células/cm² en placas de 24 cavidades (Costar) y se cultivó como previamente. Las células en su fase de crecimiento exponencial se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones de compuesto. También, se recogió el sobrenadante del medio de cultivo para evitar la pérdida de células apoptóticas o mitóticas. Luego, las células se lavaron usando PBS y se desprendieron mediante 0,05% (p/v) tripsina y 0,02% (p/v) EDTA (Gibco). La actividad de la tripsina se detuvo usando medio de cultivo. Las fracciones de células adherentes y no adherentes se agruparon y centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Las células se volvieron a suspender en PBS y se realizó el recuento usando un contador de células Multisizer 3 (Beckman Coulter). Se agregó etanol para la fijación (70% v/v) y las células se mantuvieron a -20°C durante la noche.....

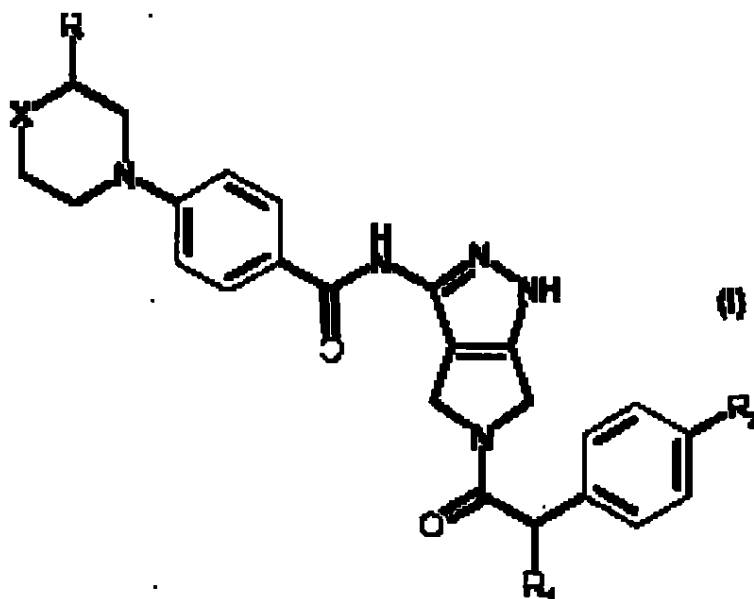
Se centrifugó un millón de células fijas a 2000 rpm durante 5 minutos y se lavó con PBS coloreándose seguidamente durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad agregando 200 ml:25 mg/ml de yoduro de propidio (Sigma) y 15 ug/ml de RNasa A (Sigma), 0,001% (v/v) Nonidet P40 (Sigma) en citrato

de sodio (0,1% (p/v), pH 7,5. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo a una excitación de 488 nm (FACSCalibur, Beckton Dickinson) usando el software Cell Quest 3.0 (Beckton Dickinson). Típicamente se recogieron 10000 eventos (activando dobles se discrimina el módulo DDM y se seleccionan sólo las células individuales) y se registraron los perfiles del ciclo celular usando CellQuest (Verity Software). La distribución del ciclo celular de la población se calculó usando un modelo modificado en software Modifit 3.1 (Verity Software) expresándose en % G0/G1, S, G2/M y poliploide.

Dados los precedentes ensayos, los compuestos de fórmula (I) de la invención resultaron poseer una notable actividad inhibitoria de la proteína quinasa, p.ej. actividad inhibitoria de la Aurora 2. Véase, como ejemplo, la siguiente tabla I que expresa los datos experimentales de cuatro compuestos representativos de la invención testeados como inhibidores de la Aurora-2 quinasa (IC_{50} nM), por su efecto antiproliferativo celular (IC_{50} nM) y por su capacidad de ejercer el bloqueo del ciclo celular e inducir el poliploide (% G2/M + poliploide a 200 nM).

Interesantemente, estos mismos compuestos se testearon en

comparación con un compuesto del arte previo muy cercano estructuralmente, definido aquí como compuesto de Referencia, que se divulga específicamente en la ya mencionada WO 02/12242 - véase pag. 160, líneas 5-7 de la misma; el compuesto de Referencia se denominó en esa N-{5-fenilacetil-4,6-dihidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazino)benzamida.



Compuesto de referencia ($R = R_1 = R_2 = H$, $X = NMe$)
 N-{5-fenilacetil-4,6-dihidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazino)benzamida;
 Compuesto (1) ($R = R_2 = H$, $R_1 = OMe$, $X = NMe$)

N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida;
Compuesto (11) (R = R₂ = H, R₁ = Me, X = NMe)
N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida;
Compuesto (6) (R = R₂ = H, R₁ = OMe, X = CH₂)
N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;
Compuesto (5) (R = Me, R₁ = OMe, R₂ = H, X = NMe)
4-(3,4-dimetilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida.
Tabla I

Compuesto	Inhibición Aurora-2 IC ₅₀ (nM)	Antiproliferación celular IC ₅₀ (nM)	Bloqueo Ciclo Celular (% G2/M + poliploide a 200 nM)
Compuesto referencia	140	220	33
ninguno	---	---	19
(1)	16	31	90
(11)	63	17	90
(6)	37	30	90
(5)	18	50	90

Sorprendentemente, la actividad inhibitoria de Aurora-2 de los compuestos de la invención resultó ser constante y marcadamente superior a la del compuesto de referencia. ... Además, aquellos mismos compuestos resultaron poseer un efecto antiproliferativo celular junto con la capacidad de bloquear el ciclo celular e inducir poliploidia significativamente superiores a las del compuesto de Referencia testeado en las mismas condiciones.

De todo lo que antecede, los nuevos compuestos de fórmula (I) de la invención parecen estar dotados de un perfil biológico, considerado como un todo, inesperadamente superior al arte previo más próximo de la WO 02/12242 y entonces son particularmente ventajosos, en terapia, contra desórdenes proliferativos asociados con una actividad alterada de la Aurora-2 quinasa.

Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados como agentes simples o, alternativamente, en combinación con tratamientos anticáncer conocidos tales como terapia por radiación o quimioterapia en combinación con agentes citostáticos o citotóxicos, agentes tipo antibiótico, agentes alquilantes, agentes antimetabolito, agentes hormonales, agentes inmunológicos, agentes tipo interferón,

inhibidores de la ciclooxigenasa (p.ej. inhibidores de COX-2), inhibidores de la matrixmetaloproteasa, inhibidores de la telomerasa, inhibidores de la tirosina quinasa, agentes receptores del factor antitumor, agentes anti-HER, agentes anti-EGFR, agentes antiangiogénesis (p.ej. inhibidores de la angiogénesis), inhibidores de la farnesil transferasa, inhibidores del trayecto de transducción de la señal ras-raf; inhibidores del ciclo celular, inhibidores de otras cdk's, agentes de ligadura de la tubulina, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, y similares.

Si se formulan como dosis fija, dichos productos de combinación emplean los compuestos de esta invención dentro del rango de dosificación abajo descrito y el otro agente farmacéuticamente activo dentro del rango de dosificación aprobado.

Los compuestos de fórmula (I) pueden ser usados secuencialmente con conocidos agentes anticáncer cuando una formulación de combinación sea inapropiada.

Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención, adecuados para administración a un mamífero, p.ej. a humanos, pueden ser administrados por las vías usuales y el nivel de

dosificación depende de la edad, peso, condiciones del paciente y vía de administración.

Por ejemplo, una dosificación adecuada adoptada para la administración oral de un compuesto de fórmula (I) puede estar comprendida entre alrededor de 10 y alrededor de 500 mg por dosis, entre 1 y 5 veces por día. Los compuestos de la invención pueden ser administrados en una variedad de formas de dosificación, p.ej. oralmente, en forma de comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos con azúcar o película, soluciones líquidas o suspensiones; rectalmente en forma de supositorios; parenteralmente, p.ej. intramuscularmente, o a través de inyección o infusión intravenosa y/o intratecal y/o intraespinal.

La presente invención incluye también composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede ser un vehículo o un diluyente.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención se preparan usualmente siguiendo métodos convencionales y se administran en forma farmacéutica adecuada.

Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, aparte del compuesto activo, diluyentes, p.ej. lactosa, dextrosa, sacarosa, sucrosa, celulosa, almidón de maíz y almidón de papa; lubricantes, p.ej. sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes ligantes, p.ej. almidones, goma arábiga, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona, agentes desintegrantes, p.ej. almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; colorantes; endulzantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Estas preparaciones farmacéuticas pueden ser fabricadas de manera conocida, por ejemplo mediante procedimientos de mezclado, granulado, tableteado, recubrimiento con azúcar o recubrimiento con película.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser, p.ej., jarabes, emulsiones y suspensiones.

Como ejemplo, los jarabes pueden contener, como vehículo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y sorbitol. .

Las suspensiones y las emulsiones pueden contener, como

ejemplos de vehículos, goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico.

La suspensión o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, p.ej. agua estéril, aceite de oliva, etiloleato, glicoles, p.ej. propilenglicol y, de desearse, una cantidad adecuada de lidocaína clorhidrato. .

Las soluciones para inyecciones o infusiones intravenosas pueden contener, como vehículo, agua estéril o preferentemente pueden presentarse en forma de soluciones estériles, acuosas, isotónicas, salinas, o pueden contener propilenglicol como vehículo.

Los supositorios pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, p.ej. manteca de cacao, polietilenglicol, un tensioactivo de éster ácido graso de polioxietilensorbitán.

Se dan los siguientes ejemplos con el fin de ilustrar mejor la presente invención, sin que los mismos constituyan una limitación.

EJEMPLOS.

Métodos Generales.

Se realizó cromatografía flash en gel de sílice (grado Merck 9385, 60A). La HPLC/MS se llevó a cabo en una columna Waters Terra RP 18 (4,6 x 50 mm, 3,5 μ m) usando un sistema HPLC Waters 2790 equipado con un detector 996 Waters PDA y un espectrómetro de masas cuadrupolar simple Micromass mod. ZQ equipado con una fuente de iones en electrospray (ESI). La fase móvil A era buffer de acetato de amonio 5 mM (pH 5,5 con ácido acético/acetonitrilo 95:5) y la fase móvil B era H₂O/acetonitrilo (5:95). Gradiente del 10 al 90% B en 8 minutos, retención de B al 90% 2 minutos. Detección UV a 220 nm y 254 nm. Caudal 1 ml/min. Volumen inyección 10 μ l. Scan completo, rango masa 100 a 800 amu. Voltaje capilar 2,5 KV; Temp. fuente 120°C; Cono 10V. Tiempos de retención (HPLC t.a.) dados en minutos a 220 nm o 254 nm. Masas dadas como relación m/z. La espectrometría 1H-NMR se llevó a cabo en un Mercury VX 400 que operaba a 400,45 MHz equipado con una sonda de resonancia doble de 5 mm (1H{15N-31PP}ID_PFG Varian).

Ejemplo 1

Preparación de 5-tert-butil 1 etil 3 amino-4,6-dihidropirrolo
[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato

Una solución de etilclorocarbonato (8,9 ml, 93 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 250 ml) se agregó lentamente a una

mezcla de tert-butil 3-amino-4,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-5(1H)-carboxilato (20 g, 89 mmol) y diisopropiletilamina (DIEA, 92 ml, 528 mmol) en THF (500 ml) a 0-5°C. La reacción se mantuvo a la misma temperatura durante 2 horas y luego se la dejó alcanzar la temperatura ambiente, agitándose durante la noche. La mezcla obtenida se evaporó a sequedad bajo vacío, y el residuo resultante se extrajo con etilacetato (AcOEt) y agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. La mezcla se purificó por cromatografía flash (eluyente: etilacetato/ ciclohexano 4/6 a 7/3) para dar 19 g del compuesto del título como sólido blanco. $[M+H]^+$ 297.....

Ejemplo 2

Preparación de 5-tert-butil 1-etil 3-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato

Se agregó oxalilcloruro (23,2 ml, 265 mmol) a una suspensión de ácido 4-(4-metil-1-piperazinil)-benzoico (11,7 g, 53 mmol) en diclorometano (DCM, 320 ml) y dimetilformamida (DMF, 0,52 ml). Luego de someter la mezcla a reflujo durante 6,5 horas, se eliminaron cuidadosamente los volátiles a presión reducida (tomando el residuo tres veces con tolueno).

El resultante 4-metilpiperazino-benzoil cloruro diclorhidrato se agregó en porciones a una solución de 5-tert-butil 1-etil 3-amino-4,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato (13,1 g, 44,3 mmol) en THF seco (620 ml) y DIEA (54,4 ml, 0,32 mol) agitando a la temperatura ambiente. La suspensión resultante se agitó 16 horas a la temperatura ambiente y 1 h a 40°C.

Después de la eliminación del solvente a presión reducida, el residuo se tomó con AcOEt (600 ml) y la capa orgánica se lavó con carbonato de sodio acuoso (200 ml), salmuera, (200 ml) y se secó sobre sulfato de sodio.

Se evaporó el solvente, y el residuo se trituroó con una mezcla de dietiléter (Et₂O, 135 ml) y AcOEt (15 ml), se filtró, se secó al vacío a 40°C para dar 20 g del compuesto del título como polvo blanco [M+H]⁺ 499.

Operando en forma análoga y haciendo reaccionar 5-tert-butil 1-etil 3-amino-4,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato con el derivado de acilcloruro apropiado, se prepararon los siguientes compuestos.

5-tert-butil-etil 3-{[4-(4-etilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 513.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(4-isopropilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrollo[3,4-(5)c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 527.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrollo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 525.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(3,4-dimetilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrollo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 513.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(4-piperidin-1-ilbenzoil)amino]-4,6-dihidropirrollo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 484.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(4-fluoropiperidin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrollo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 502.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(4-morfolin-4-ilbenzoil)amino]-4,6-dihidropirrollo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 486.

5-tert-butyl 1-ethyl 3-{[4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrollo[3,4-(5)c]pirazol-1,5-dicarboxilato; [M+H]⁺ 541.

Ejemplo 3

Preparación de etil 3-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrollo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato

triclorhidrato

Una solución 4N de ácido clorhídrico en dioxano (122 ml, 488 mmol) se agregó por goteo a una solución agitada de 5-tert-butyl 1-etil 3-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-4,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1,5-dicarboxilato (19,5 g, 39,2 mmol), preparada como en el Ejemplo 2, en DCM seco (240 ml); la precipitación de un sólido blanco se produjo casi inmediatamente. La mezcla resultante se agitó a la temperatura ambiente durante 24 horas, después de la dilución con Et₂O (100 ml), el sólido se filtró, se lavó a fondo con Et₂O, y se secó al vacío a 50°C para dar 20,1 g del compuesto del título, usado en el siguiente paso sin más purificación. [M+H]⁺ 399.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,4 (t, 3H); 2,8 (d, 3H); 3,2 (m, 4H); 3,5 (m, 2H); 4,1 (m, 2H); 4,4 (q, 2H); 4,6 (m, 4H); 7,1-8,0 (m, 4H); 10,3 (bs, 2H); 10,7 (bs, 1H); 11,4 (s, 1H).

Operando como se expresa previamente y comenzando con el intermediario adecuado, se prepararon análogamente los siguientes compuestos:

etil 3-{[4-(4-etil piperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato triclorhidrato; [M+H]⁺ 413.

etil 3-{[4-(4-isopropil piperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato
 triclorhidrato; [M+H]⁺ 427.
 etil 3-{[4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato
 triclorhidrato; [M+H]⁺ 425.
 etil 3-{[4-(3,4-di metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato
 triclorhidrato; [M+H]⁺ 413.
 etil 3-{[4-(4-piperidin-1-ilbenzoil)amino]-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1 (4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 384.
 etil 3-{[4-(4-fluoropiperidin-1-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato
 triclorhidrato; [M+H]⁺ 402.
 etil 3-{[4-(4-morfolin-4-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato
 triclorhidrato; [M+H]⁺ 386.
 etil 3-{[4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato
 triclorhidrato; [M+H]⁺ 441.
Ejemplo 4
Preparación de etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-3-[4-

(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-c] pirazol-1 (4H)-carboxilato

Se agregó oxalil cloruro (10.1.2 ml, 115 mmol) a una solución de ácido R-(-)- α - metoxifenilacético (1,91 g, 11,5 mmol) en DCM (90 ml) y DMF (0,50 ml). Luego de agitar la mezcla a la temperatura ambiente durante 16 horas, los volátiles se retiraron cuidadosamente a presión reducida.

Una solución del resultante R-(-)- α -metoxifenilacetil cloruro en DCM (20 ml) se agregó por goteo a una solución de etil 3-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-

dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato triclorhidrato (4,5 g, 8,9 mmol) en DCM (400 ml) y DIEA (11,8 ml, 69 mmol) agitando a la temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante 20 horas a la temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se lavó seguidamente con carbonato de sodio acuoso (200 ml), salmuera, (200 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. Se evaporó el solvente, y el residuo se trituroó con una mezcla de Et₂O (100 ml) y AcOEt (10 ml), se filtró, y se secó al vacío a 40°C para dar 3,94 g del compuesto del título como polvo blanco, usado en el siguiente paso sin más purificación. [M+H]⁺ 547;

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,3 (t, 3H); 2,3 (d, 3H); 2,6 (m, 4H);
3,3 -3,4 (m, 7H); 4,3 (q, 2H); 4,6- 4,9 (m, 4H); 5,1 (d, 1 H)
7,0- 8,0 (m, 9H); 11,1 (d, 1 H).

Operando como se manifiesta más arriba y comenzando con el
derivado de acilcloruro adecuado, se prepararon análogamente
los siguientes compuestos:

etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-fenil etanoil]-3-{[4-(4-etil
piperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-
c]pirazol-1(4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 561.

etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-3-{[4-(4-isopropil
piperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-
c]pirazol-1(4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 575.

etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-fenil etanoil]-3-{[4-(4-ciclopropil
piperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-
c]pirazol-1 (4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 573

etil 3-{[4-(3,4-dimetilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5-[(2R)-
2-metoxi-2-fenil etanoil]-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1
(4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 561.

etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-3-[(4-piperidin-1-
ilbenzoil]amino]-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-
carboxilato; [M+H]⁺ 532.

etil 3-{[4-(4-fluoropiperidin-1-il)benzoil]amino}-5-[(2R)-2-

metoxi-2-feniletanoil]-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1
 (4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 550.

etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-fenil etanoil]-3-[(4-morfolin-4-il
 benzoil)amino]-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-
 carboxilato; [M+H]⁺ 534.

etil 3-{[4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5-
 [(2R)-2-metoxi-2-fenil etanoil]-5,6-dihidropirrolo[3,4-
 c]pirazol-1(4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 589.

etil 5-[(2R)-2-metil-2-fenil etanoil]-3-{[4-(4-etilpiperazin-
 1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1 (4H)-
 carboxilato [M+H]⁺ 545.

etil 5-[(2R)-2-metil-2-fenil etanoil]-3-{[4-(4-isopropil
 piperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrolo[3,4-
 c]pirazol-1(4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 559.

etil 5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-3-{[4-(4-
 ciclopropilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-
 dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1 (4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 557.

etil 3-{[4-(3,4-dimetilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5-[(2R)-
 2-metil-2-fenil etanoil]-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-
 1(4H)-carboxilato; [M+H]⁺ 545.

etil 5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-3-[(4-piperidin-1-
 ilbenzoil)amino]-5,6-dihidropirrolo[3,4-c]pirazol-1(4H)-

carboxilato; $[M+H]^+$ 516.

etil 3-{[4-(4-fluoropiperidin-1-il)benzoil]amino}-5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-5,6-dihidropirrólo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato; $[M+H]^+$ 534.

etil 5-[(2R)-2-metil-2-fenil etanoil]-3-[(4-morfolin-4-il benzoil)amino]-5,6-dihidropirrólo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato; $[M+H]^+$ 518.

etil 3-{[4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5-[(2R)-2-metil-2-fenil etanoil]-5,6-dihidropirrólo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato; $[M+H]^+$ 573.

etil 5-[(2R)-2-hidroxi-2-fenil etanoil]-3-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrólo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato; $[M+H]^+$ 533.

Ejemplo 5

Preparación de N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrólo [3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida (1)

Una solución de etil 5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-3-{[4-(4-metilpiperazin-1-il)benzoil]amino}-5,6-dihidropirrólo[3,4-c]pirazol-1(4H)-carboxilato (3,94 g, 7,2 mmol) en metanol (MeOH, 130 ml) y trietilamina (Et₃N, 13 ml) se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas (se produjo alguna

precipitación). El sólido se separó y lavó con Et₂O, para dar 1,6 g del compuesto del título. La solución se evaporó hasta unos pocos mililitros, y se separó una segunda fracción de producto sólido (1,62 g). Las dos fracciones se unieron y analizaron por LC-MS (pureza alrededor del 90% 254 y 220 nm). Luego de la purificación cromatográfica (columna corta de gel de sílice, se obtuvieron DCM/MeOH 45:5) 2,83 g (83%) del compuesto del título como sólido blanco. P.f. 289°C; [M+]⁺; 475;

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 2,21 (s, 3H); 2,43 (m, 4H); 3,29 (m, 7H); 4,20- 4,90 (m, 4H); 5,09 (s, 1H) 6,80-8,00 (m, 9H); 10,6 (br, 1H); 12,09 (br, 1H).

Operando en forma análoga, a través de hidrólisis básica de los compuestos del ejemplo 4, se prepararon los siguientes compuestos:

(2) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrólo[3,4-c] pirazol- 3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il)benzamida; [M+H]⁺ 489;

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,1 (t, 3H); 2,3- 2,7 (m, 6H); 3,2- 3,4 (m, 7H); 4,3-6,0 (m, 4H); 5,1 (d, 1H) 6,9-8,0 (m, 9H); 10,6 (bs, 1H); 12,1 (br, 1H).

(3) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-

- tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)benzamida; $[M+H]^+$ 503;
- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm 1,3- 1,3 (dd, 6H); 3,3- 3,4 (m, 9H); 4,6- 4,9 (m, 4H); 5,1 (d, 1H); 7,0- 8,0 (m, 9H); 10,7 (bs, 1H); 12,3 (bs, 1H).
- (4) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il)benzamida; $[M+H]^+$ 501 ;
- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 0,3- 0,5 (m, 4H); 3,2- 3,4 (m, 7H); 3,2- 5,0 (m, 4H); 5,1 (d, 1 H); 6,8- 8,2 (m, 9H); 10,5- 10, 7 (br, 1H); 12,0- 12,4 (br, 1 H).
- (5) 4-(3,4-dimetil piperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida; $[M+H]^+$ 489;
- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 1,0 -1,1 (m, 3H); 2,24 (s, 3H); 3,3- 3,5 (m, 7H); 4,3- 5,0 (m, 4H); 5,1 (d, 1H); 6,9-8,0 (m, 9H); 10,6 (bs, 1H); 11,9-12,6 (br, 1H).
- (6) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-fenil etanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida; $[M+H]^+$ 460;
- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ppm: 1,5- 1,7 (m, 6H); 3,2- 3,4 (m, 7H);

- 4,3- 4,9 (m, 4H); 5,1 (d, 1H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,4 -10,7 (br, 1H).
- (7) 4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida; [M+H]⁺ 478;
- ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 165 -2,1 (m, 4H); 3,15- 3,6 (m, 7H); 4,35- 5,0 (m, 5H); 5,1 (d, 1H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,4 -10,7 (br, 1H).
- (8) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-morfolin-4-ilbenzamida; [M+H]⁺ 462;
- ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 3,15- 3,5 (m, 7H); 3,7- 3,8 (m, 4H); 4,3- 4,9 (m, 4H); 5,1 (d, 1H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,4 -10,7 (br, 1H).
- (9) 4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida; [M+H]⁺ 517.
- (10) N-{5-[(2R)-2-hidroxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida; [M+H]⁺ 461.
- ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm, 2,3 (s, 3H); 2,45- 2,65 (m, 4H); 3,2- 3,4 (m, 4H); 4,1 -4,9 (m, 4H); 5,69 (d, 1 H); 6,9- 8,0 (m,

9H); 10,4 -10,7 (br, 1 H); 11,5- 12,9 (br, 1H).

(11) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida; [M+H]⁺ 459;

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm, 1,33 (d, 3H); 2,21 (s, 3H); 3,85- 5,0 (m, 5H); 4,2- 4,9 (m, 4H); 5,1 (s, 1H) 6,8- 8,0 (m, 9H); 10,3 -10,7 (br, 1H); 11,8 -12,5 (br, 1H).

(12) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il)benzamida; [M+H]⁺ 473;

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,06 (t, 3H); 1,36 (d, 3H); 2,41 (q, 2H); 2,47-2,6 (m, 4H); 3,2- 3,4 (m, 4H); 3,9- 5,0 (m, 5H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,5 (bs, 1 H); 11,9- 12,5 (br, 1 H). ...

(13) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)benzamida; [M+H]⁺ 487;

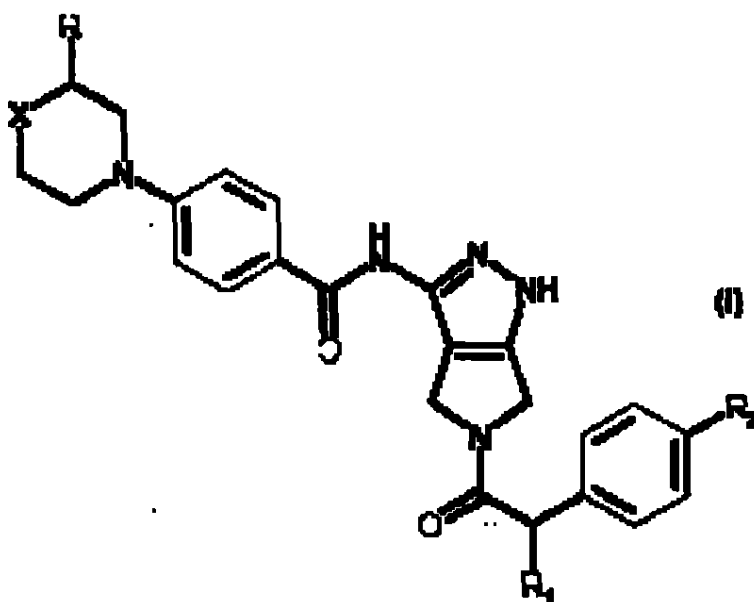
(14) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il)benzamida; [M+H]⁺ 485;

(15) 4-(3,4-dimetilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida; [M+H]⁺ 473;

- (16) N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida; [M+H]⁺ 444;
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,37 (d, 3H); 1,6 (s, 6H); 3,2- 3,4 (m, 4H); 3,90- 4,05 (m, 1H); 4,1 -4,9 (m, 4H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,4 -10,7 (br, 1 H).
- (17) 4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida; [M+H]⁺ 462;
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,37 (d, 3H); 1,65- 2,05 (m, 4H); 3,15- 3,6 (m, 7H); 3,2- 3,4 (m, 4H); 3,85- 4,07 (m, 1 H); 4,1 -5,05 (m, 5H); 5,1 (d, 1 H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,4- 10,7 (br, 1 H).
- (18) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-morfolin-4-ilbenzamida; [M+H]⁺ 446;
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1,37 (d, 3H); 3,2- 3,4 (m, 4H); 3,7- 3,85 (m, 4H); 3,9 -4,1 (m, 1 H); 4,1 -4,95 (m, 4H); 6,9- 8,0 (m, 9H); 10,4 -10,7 (br, 1 H).
- (19) 4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida; [M+H]⁺ 501.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar desórdenes proliferativos celulares causados por y/o asociados con una actividad alterada de la proteína quinasa que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I)



donde

R es hidrógeno o metilo;

R₁ es hidroxilo o un grupo C₁-C₃ alquilo o alcoxi recto o ramificado;

R₂ es un átomo de hidrógeno o halógeno;

X es un grupo divalente seleccionado entre metileno (-CH₂-) o fluorometileno (-CHF-), o es un heteroátomo o grupo heteroatómico seleccionado entre oxígeno (-O-) o nitrógeno (-NR'-) donde R' es un átomo de hidrógeno, un grupo C₁-C₄ alquilo o un grupo C₃-C₆ cicloalquilo recto o ramificado; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 para tratar desórdenes proliferativos celulares causados por y/o asociados con una actividad alterada de las Aurora quinasas.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde la Aurora quinasa es Aurora 2.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el desorden proliferativo celular se selecciona dentro del grupo consistente en cáncer, enfermedad de Alzheimer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes y desórdenes neurodegenerativos.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el cáncer se selecciona dentro del grupo consistente en carcinoma, carcinoma de célula escamosa, tumores hematopoyéticos de linaje mieloide o linfoide, tumores de origen mesenquimal, tumores del sistema nervioso central y periférico, melanoma, seminoma, teratocarcinoma,

osteosarcoma, xeroderma pigmentosum, keratoxantoma, cáncer folicular tiroideo y sarcoma de Kaposi.

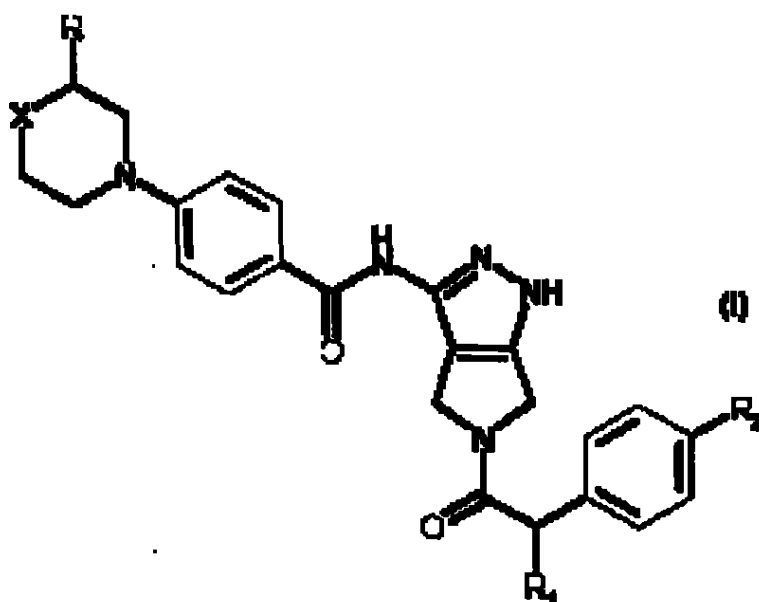
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el desorden proliferativo celular se selecciona dentro del grupo consistente en hiperplasia benigna de próstata, adenomatosis familiar, poliposis, neuro-fibromatosis, psoriasis, proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, glomerulonefritis y estenosis y restenosis post-quirúrgica.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además el someter a un mamífero que lo necesite a un régimen de terapia de radiación o quimioterapia en combinación con un agente citostático o citotóxico.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el mamífero que lo necesite es un humano.

9. Un método para inhibir la actividad de la Aurora 2 quinasa que comprende poner en contacto dicha quinasa con una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Un compuesto de fórmula (I):



donde

R es hidrógeno o metilo;

R₁ es hidroxilo o un grupo C₁-C₃ alquilo o alcoxi recto o ramificado;

R₂ es un átomo de hidrógeno o halógeno;

X es un grupo divalente seleccionado entre metileno (-CH₂-) o fluorometileno (-CHF-), o es un heteroátomo o grupo heteroatómico seleccionado entre oxígeno (-O-) o nitrógeno (-NR'-) donde R' es un átomo de hidrógeno, un grupo C₁-C₄ alquilo o un grupo C₃-C₆ cicloalquilo recto o ramificado; o

una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

11. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 10, donde R es hidrógeno o metilo; R_1 se selecciona entre hidroxilo, metilo o metoxi; R_2 es un átomo de hidrógeno o flúor; X se selecciona entre metileno, fluorometileno, -O- o -NR', donde R' es como se define en la reivindicación 10.

12. Un compuesto de fórmula (I), de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado dentro del grupo consistente en:

(1) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrólo [3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida;

(2) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrólo [3,4-c] pirazol- 3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il)benzamida;

(3) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrólo [3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)benzamida;

(4) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrólo [3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-

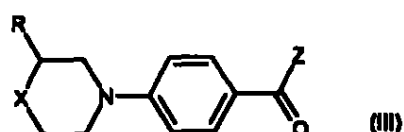
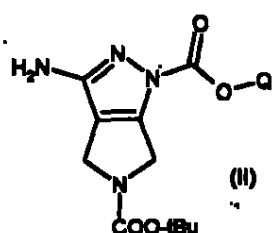
- ciclopropilpiperazin-1-il)benzamida;
- (5) 4-(3,4-dimetil piperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;
- (6) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-fenil etanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;
- (7) 4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;
- (8) N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-morfolin-4-ilbenzamida;
- (9) 4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;
- (10) N-{5-[(2R)-2-hidroxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida;
- (11) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida;

- (12) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il)benzamida;
- (13) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)benzamida;
- (14) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il)benzamida;
- (15) 4-(3,4-dimetilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;
- (16) N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;
- (17) 4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;
- (18) N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il}-4-morfolin-4-ilbenzamida;
- (19) 4-(4-tert-butilpiperazin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-

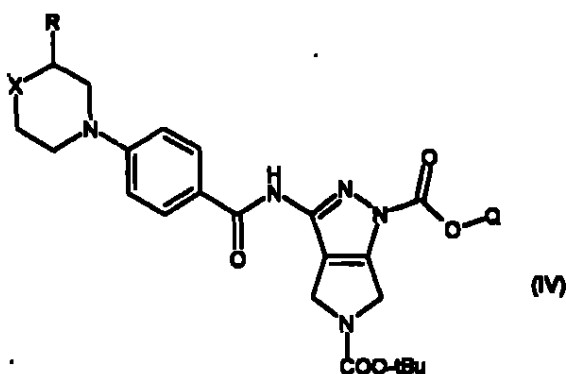
fenilpropanoil]-1,4,5,6- tetrahidropirrolo[3,4-c]pirazol-3-il)benzamida;

13. Un procedimiento para preparar los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 10, dicho procedimiento comprende:

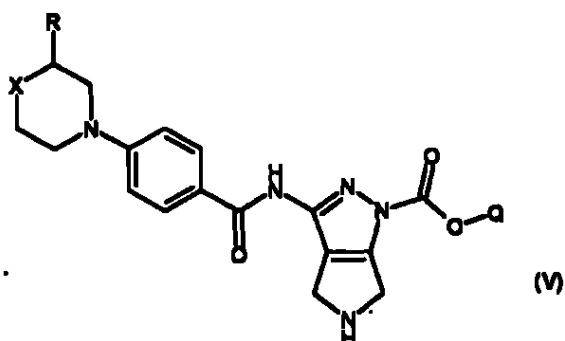
a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III)



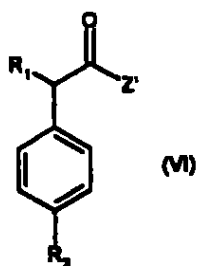
donde R y X son como se define en la reivindicación 10, Q es un grupo alquilo inferior, t-Bu representa tert-butilo y Z es hidroxilo o un grupo saliente adecuado, de modo de obtener un compuesto de fórmula (IV)



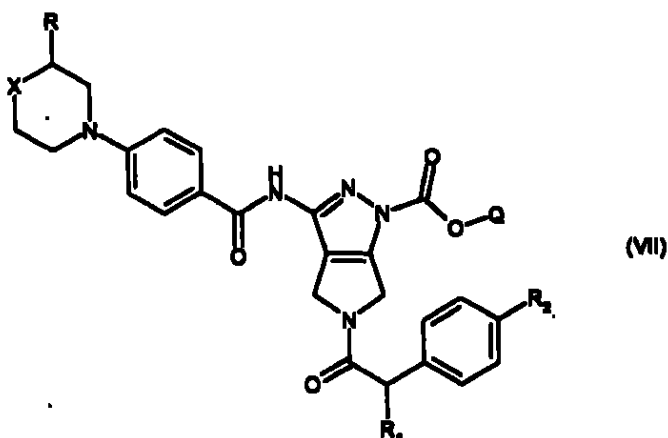
b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (IV) bajo condiciones ácidas de modo de obtener un compuesto de fórmula (V)



c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (V) con un compuesto de fórmula (VI)



donde R₁ y R₂ son como se define en la reivindicación 10, y Z= representa hidroxí o un grupo saliente adecuado, de modo de obtener un compuesto de fórmula (VII)



- d) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (VII) bajo condiciones básicas de modo de obtener el compuesto correspondiente de fórmula (I) y, si se desea, convertirlo en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, donde, dentro de los compuestos de fórmula (II), Q representa un grupo alquilo C₁-C₄ recto o ramificado.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, donde Q es metilo o etilo.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, donde, dentro de los compuestos de fórmula (III) y (VI), Z y Z' son cada uno independientemente hidroxilo o un átomo de halógeno.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16,

- donde el átomo de halógeno es cloro.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, donde el paso (b) se lleva a cabo bajo condiciones acídicas en presencia de ácido clorhídrico, trifluoroacético o metansulfónico.
19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, donde el paso (d) se lleva a cabo bajo condiciones básicas en presencia de hidróxido de sodio, potasio o litio, o de una amina terciaria tal como trietilamina.
20. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 10, y al menos un excipiente, vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
21. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20 que comprende además uno o más agentes quimioterapéuticos.
22. Un producto o kit que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 10, o composiciones farmacéuticas del mismo como se define en la reivindicación 20, y uno o más agentes quimioterapéuticos, como preparación combinada para

el uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia contra el cáncer.

23. Un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 10, para usar como medicamento.

24. Uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en la reivindicación 10, en la fabricación de un medicamento con actividad antitumoral.

RESUMEN

DERIVADOS DE PIRROLO [3,4-c]PIRAZOL ACTIVOS COMO
INHIBIDORES DE QUINASA, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN Y
COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS COMPRENDEN

Se divulgan derivados de pirrolo[3,4-c]pirazol de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, según se define en la memoria, un procedimiento para su preparación y composiciones farmacéuticas que los comprenden, los compuestos de la invención pueden ser útiles, en terapia, en el tratamiento de enfermedades asociadas con una actividad desregulada de la proteína quinasa, como el cáncer.

TRATADO DE COOPERACIÓN SOBRE PATENTES

P C T

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación Sobre Patentes)

(PCT Artículo 36 y Norma 70)

Referencia del Registro del Solicitante o Agente 3044/MNM/lr	PARA MÁS ACCIÓN	Ver Formato PCT/PEA/416
Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/0075 15	Fecha Registro Internacional (día/mes/año) 08.07.2004	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 09.07.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o Clasificación Nacional e IPC C07D487/04, A61K31/4162, A81P35/00		
Solicitante PHARMACIA ITALIA S.P.A. et al.		
1. Este informe es el reporte preliminar internacional del examen, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional de acuerdo con el Artículo 35 y transmitido al solicitante de acuerdo con el Artículo 36. 2. Este INFORME consta de un total de 5 páginas, incluyendo esta cubierta. 3. Este reporte también está acompañado por ANEXOS que comprenden: a. ☐ <i>Enviados a solicitante y a la agencia Internacional) un total de hojas, como sigue:</i> ☐ Hojas de la descripción, reivindicaciones y/o planos que han sido enmendados y son la base de este reporte y/u hojas que contienen		


VICTOR M. ROJAS
 Traductor e Intérprete Oficial
 Resolución No. J286
 Minjusticia 1997

rectificaciones autorizadas por esta autoridad (Ver norma 70.16 y Sección 607 de las instrucciones administrativas). ☐ Hojas que reemplazan hojas anteriores, pero que esta autoridad considera que contienen una enmienda que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se registra, como se indica en el Punto 4 de la Casilla No. 1 y la Casilla complementaria. b. ☐ (<i>Enviado a la Agencia Internacional solamente</i>) un total de (indique clase y número de envíos electrónicos), que contienen una secuencia de listas y/o tablas relacionadas allí, en formato de computador sólo para lectura solamente, como se indica en Casilla complementaria que se relaciona con la lista (Ver sección 802 de las Instrucciones Administrativas.	
4. Este informe contiene indicaciones que se relacionan con los siguientes puntos ☒ Casilla No. I Base de la opinión ☐ Casilla No. II Prioridad ☐ Casilla No. III No establecimiento de opinión con respecto de la novedad, paso de inventiva y aplicabilidad industrial. ☐ Casilla No. V Certificación sustentada de acuerdo con el Artículo 35(2) con respecto de la novedad, paso de inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que respaldan esta certificación.	
Fecha de presentación de la solicitud 09.05.2005.	Fecha de elaboración de este informe 08.08.2005
Nombre y dirección postal de la autoridad examinadora internacional preliminar Oficinas de Patentes de Europa D-80298 Munich Tel. +49 892399- 0 Tx 523656 Fax: +49 89 23 99 – 4465	Funcionario Autorizado Steendjk, M Teléfono No. + 49 89 2399 +8460


VICTOR M. ROJAS G.
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 3286
Minjusticia 1997

Resolución No. 3286
Minjusticia 1997

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007515

Casilla No. III No establecimiento de opinión con respecto de novedad, paso de Inventiva y aplicabilidad Industrial

1. Las preguntas sobre si la invención reivindicada parece ser novedosa, para incluir un paso de inventiva (que no es evidente), o para que sea industrialmente aplicable no han sido examinadas con respecto de :

- ☐ Reivindicaciones No. 1-9
porque
- ☐ La solicitud internacional, de las mencionadas reivindicaciones No. 1-9 se relacionan con el siguiente objeto que no requiere un examen preliminar internacional (especificar):

Ver hoja separada anexa

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007515

Casilla No. V Declaración sustentada de acuerdo con el Artículo 35(2) con respecto de la novedad, paso de inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que respaldan esta declaración.

1. Declaración		
Novedad (N)	Si: Reveindicaciones	1-24
	No: Reveindicaciones	
Paso de inventiva (IS)	Si: Reveindicaciones	1-24
	No: Reveindicaciones	
Aplicabilidad (IA)	Si: Reveindicaciones	10-24
	No: Reveindicaciones	

2. Cita y explicaciones (Norma 70.7):
Ver hoja separada


VICTOR M. ROJAS G.
Productor e Intérprete Oficial
Resolución No. 3286
Minjusticia 1997

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007515

- 1) La presente solicitud se relaciona con derivados de pirrolopirazol que tienen actividad inhibidora de la kinasa de proteína, en particular con respecto de Aurora 2.

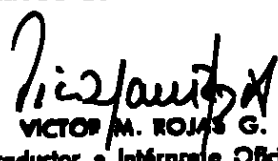
- 2) Citado en arte anterior:

D1: WO 02/12242 A (PÍTTALA VALERIA; VARASI MARIO (IT); FANCELLI DANIELE (IT) PHARMACIA) 14 Febrero 2002 (2002-02-14)

- 3) Novedad, paso de inventiva

El Documento D1 ya describe los pirrolopirazoles de una fórmula general que comprende los compuestos actualmente definidos que tienen kinasa de proteína (incluyendo Aurora 2) que inhibe la actividad. Los compuestos particulares como se definen actualmente, que tienen una sustitución característica R1 en el grupo Fenilacetil en combinación con el grupo benzamida sustituido por la amina, si embargo, no ha sido específicamente descrito en D1

Con respecto a D1 como el arte anterior más cercano, que ya describe los derivados de los pirrolopirazol, que tienen kinasa de proteína que inhibe la actividad, incluyendo actividad con respecto a Aurora 2, los compuestos actualmente definidos representan una selección. En las páginas 16 y 17 la descripción de la aplicación actual proporciona los resultados de la prueba comparativa de compuestos representativos de


VICTOR M. ROJAS G.
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 3286
Minjurica 1997

la presente aplicación y el ejemplo estructuralmente más importante de D1 (ejemplo 234 en la página 25). Estos resultados indican que la materia reivindicada realmente representa una solución al problema de dar mejores agentes con actividad que inhibe Aurora 2.

Como ningún arte anterior sugiere que los compuestos actualmente definidos muestren esta actividad mejorada, la materia reivindicada puede reconocerse como un paso de inventiva.

4) Otras observaciones

La reivindicaciones 1-9 se relacionan con el objeto considerado por esta autoridad que está comprendido por las disposiciones de la Norma 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará ninguna opinión con respecto de la aplicabilidad industrial del objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4) (a)(I) PCT).


VICTOR M. ROJAS G.
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 3286
Minjusticia 1997

PATENT COOPERATION TREATY

000118

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 3044MNM/r	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/EP2004/007515	International filing date (day/month/year) 08.07.2004	Priority date (day/month/year) 09.07.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D487/04, A61K31/162, A61P35/00		
Applicant PHARMACIA ITALIA S.P.A. et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 35. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.10 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 602 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 09.05.2005	Date of completion of this report 08.08.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80299 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 623666 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Steendijk, M Telephone No. +49 89 2399-8460 	

000119

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/EP2004/007515

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-9

because.

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-9 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

000120

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No. 120
PCT/EP2004/007515

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-24
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-24
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	10-24
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

000121

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/007515

- 1) The present application relates to pyrrolopyrazole-derivatives having protein kinase inhibiting activity, in particular with respect to Aurora 2.
- 2) Cited prior art:
D1: WO 02/12242 A (PITTALA VALERIA ; VARASI MARIO (IT); FANCELLI DANIELE (IT); PHARMACIA) 14 February 2002 (2002-02-14)
- 3) Novelty, Inventive step
Document D1 already describes pyrrolopyrazoles of a general formula covering the presently defined compounds having protein kinase (including Aurora 2), inhibiting activity. The particular compounds as presently defined, which carry a characteristic R1-substitution in the phenylacetyl group in combination with the cyclic amine-substituted benzamide group, have however not been specifically described in D1.

With respect to D1 as closest prior art, which already describes pyrrolopyrazole derivatives having protein kinase inhibiting activity, including activity with respect to aurora 2, the presently defined compounds represent a selection.

On pages 16 and 17 the description of the present application provides results of comparative test of representative compounds of the present application and the structurally most relevant example of D1 (ex. 234 on page 25). These results indicate that the claimed matter actually represents a solution to the problem of providing improved agents with aurora 2 inhibiting activity.

As no prior art suggests that the presently defined compounds would show such improved activity, the claimed matter may be acknowledged an inventive step.

- 4) Further observations
Claims 1-9 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

145
122

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 06000709 00000000 Folios: 124
Fecha (IMP): 2006-01-04 16:54:16
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (x) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	(✓)	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(✓)	()
-Descripción de la invención.	(✓)	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	(✓)	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	(✓)	()
COMPLETA (✓)	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

ENERO 4, 2006

128
123

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
PHARMACIA ITALIA S.P.A.

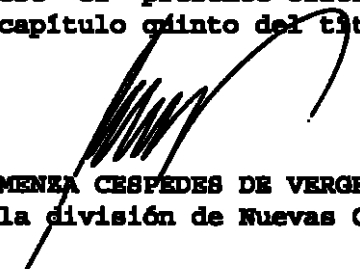
REFERENCIA	Radicación No.	6 709
	Solicitud internacional	EP2004/007515
	Fecha inicio fase nacional	09/02/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2657

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 05 MAR. 2006
jramos