

QF



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06-1246

TITULO: SAL DE ISETIONATO DE UN INHIBIDOR SELECTIVO DE CDK4

SOLICITANTE: WARNER LAMBERT COMPANY LLC

CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07D 471/04, A61K 31/519, A61P 31/12

DIRECCIÓN 201 Tabor Road, Morris Plains, New Jersey 07950, E.U.A.

APODERADO CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Enero 06 de 2006

P2006/000002

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 06001246 00000000 Folia: 103
Fecha (AMD): 2006-01-06 15:00:43
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 2006-11-ENG

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: WARNER LAMBERT COMPANY LLC

Dirección: 201 Tabor Road, Morris Plains, New Jersey 07950, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: (1) VLADIMIR GENUKH BEYLIN (2) ANTHONY CLYDE BLACKBURN
(3) DAVID THOMAS ERDMAN (4) PETER LAURENCE TOOGOOD

Dirección: (1, 2 y 4) 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, Michigan 48105, E. U. A.

(3) 301 Henrietta Street, Kalamazoo, Michigan 49001, E. U. A

Nacionalidad o Domicilio: (1, 2, 3) ESTADOUNIDENSE (4) BRITANICA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/002152

Fecha Junio 28, 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/005426

Fecha Enero 20, 2005

6

Título (54) SAL DE ISETIONATO DE UN INHIBIDOR SELECTIVO DE CDK4.

Clasificación Internacional (51) C07D 471/04, A61K 31/519, A61P 31/12, 35/00, 31/00

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Junio 11, 2003

(31) Número de Solicitud

60/486,351

9

Comprobante de pago No. 06-512

Fecha Enero 4, 2006

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si 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. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

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

36

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 86001246 00000000 Folios: 183
Fecha (AND): 2006-01-06 15:08:43
Tramite : 011/PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 512
FECHA : ENERO 4 DE 2006

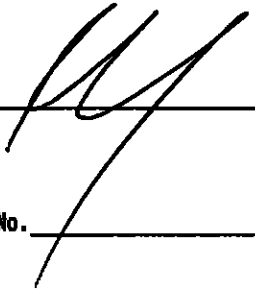
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36765275	03/01/2006	2,945,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución
2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

WARNER- LAMBERT COMPANY LLC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio
de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

Sello: recibido el 21 julio de 2003 Departamento de Patentes NYD- Pfizer Inc.

, CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth
Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía
funciones de Secretario Asistente de Warner-Lambert Company LLC, con sede en
Morris Plains, Nueva Jersey, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham
en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

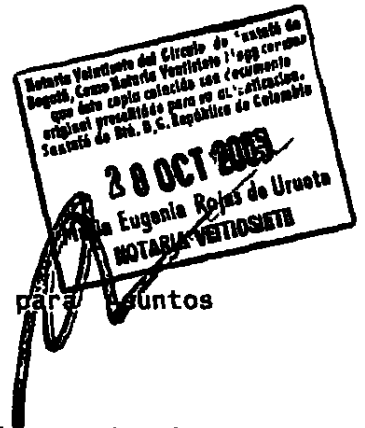
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)
REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento Público 2.ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público
- CERTIFICADO 5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos
exteriores y de la mancomunidad.
8. No. G210433
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos
exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe
presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1993

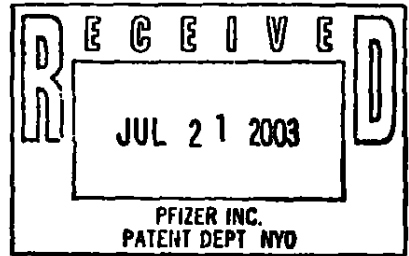


OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTÁ, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com



Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Warner-Lambert Company LLC

201 Tabor Road, Morris Plains, New Jersey 07950 USA

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

El suscrito,

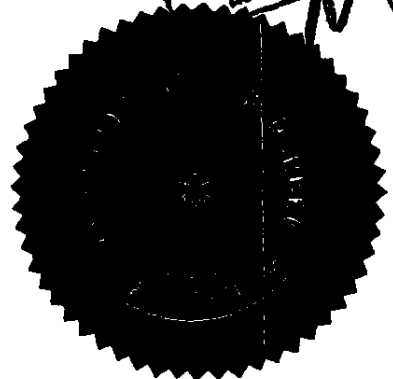
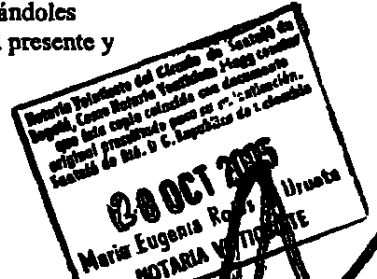
domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

Date/Fecha: July 14, 2003

City/Country/Ciudad,País: New York, USA



1937

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 No 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*
of legal age and domiciled in
New York, USA
signed the foregoing document

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant Secretary
of Warner-Lambert Company LLC

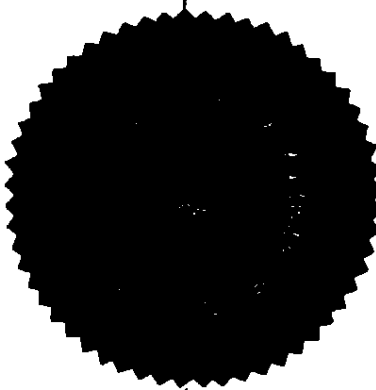
3. That Warner-Lambert Company LLC,
having its principal place of business located in
Morris Plains, New Jersey, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey
This *14th* Day Of *July* 2003
KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

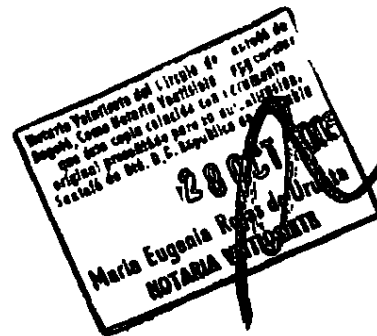
1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):



7

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

- 2 Has been signed by K Greenwood
a été signé par
- 3 Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
- 4 Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

- 5 at London/à Londres
- Certified/Attesté
6 the/le 17 July 2003
- 7 by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

- 8 Number/sous No **G210433**

- 9 Stamp.
timbre
- 10 Signature R. Bawden



A large, stylized handwritten signature, likely of R. Bawden, written in dark ink.

For the Secretary of State Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country



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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/005426 A1

- (51) International Patent Classification: C07D 471/04, A61K 31/519, A61P 31/12, 35/00
- (74) Agent: FULLER, Grover, R., Jr.; Pfizer Inc., 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).
- (21) International Application Number: PCT/IB2004/002152
- (22) International Filing Date: 28 June 2004 (28.06.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Date: 60486,351 11 July 2003 (11.07.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): WARNER-LAMBERT COMPANY LLC [US/US]; 301 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BEYLIN, Vladimir, Genukh [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105 (US). BLACKBURN, Anthony, Clyde [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105 (US). ERDMAN, David, Thomas [US/US]; 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). TOOGOOD, Peter, Laurence [GB/US]; Pfizer Global Research and Development, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105 (US).
- (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, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ISETHIONATE SALT OF A SELECTIVE CDK4 INHIBITOR

(57) Abstract: Disclosed are polymorphs of the isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2(5-piperazin-1-yl)-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is a selective cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) inhibitor useful for treating inflammation and cell proliferative diseases such as cancer and restenosis.

WO 2005/005426 A1

9

WO 2005/003426

PCT/IB2004/002152

SETHIONATE SALT OF A SELECTIVE CDK4 INHIBITOR**Background of the Invention****Field of Invention**

This invention relates to salt forms of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is a selective cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) inhibitor that is useful for treating inflammation and cell proliferative diseases such as cancer and restenosis.

DISCUSSION

Cyclin-dependent kinases and related serine/threonine protein kinases are important cellular enzymes that perform essential functions in regulating cell division and proliferation. The cyclin-dependent kinase catalytic units are activated by regulatory subunits known as cyclins. At least sixteen mammalian cyclins have been identified (D.G. Johnson and C.L. Walker, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1998) 39:285-312). Cyclin B/CDK1, Cyclin A/CDK2, Cyclin E/CDK2, Cyclin D/CDK4, Cyclin D/CDK6, and probably other heterodimers including CDK3 and CDK7 are important regulators of cell cycle progression. Additional functions of Cyclin/CDK heterodimers include regulation of transcription, DNA repair, differentiation and apoptosis (D.O. Morgan, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (1997) 13261-13291).

Cyclin-dependent kinase inhibitors may prove useful in treating cancer. Increased activity or temporally abnormal activation of cyclin-dependent kinases has been shown to result in the development of human tumors (C.J. Sherr, *Science* (1998) 274:1672-1677). Indeed, human tumor development is commonly associated with alterations in either the CDK proteins themselves or their regulators (C. Cordon-Cardo, *Am. J. Pathol.* (1995) 147:545-560; J.E. Karp and S. Broder, *Nat. Med.* (1995) 1:309-320; M. Hall et al., *Adv. Cancer Res.* (1998) 68:67-108). Naturally occurring protein inhibitors of CDKs such as p16 and p27 cause *in vitro* growth inhibition in lung cancer cell lines (A. Kamb, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1998) 227:139-148).

Small molecule CDK inhibitors may also be used in the treatment of cardiovascular disorders such as restenosis and atherosclerosis and other vascular disorders that are due to aberrant cell proliferation. Vascular smooth muscle proliferation and intimal hyperplasia following balloon angioplasty are inhibited by over-expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor protein p21 (M.W. Chang et al., *J. Clin. Invest.* (1995) 96:2280; Z-Y. Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1998) 93:9805). Moreover, the purine CDK2 inhibitor CVT-313 (K_i = 95 nM) resulted in greater than 80 % inhibition of neointima formation in rats (E.E. Brooks et al., *J. Biol. Chem.* (1997) 26207-29211).

CDK inhibitors can be used to treat diseases caused by a variety of infectious agents, including fungi, protozoan parasites such as *Plasmodium falciparum*, and DNA and RNA viruses. For example, cyclin-dependent kinases are required for viral replication following

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-2-

infection by herpes simplex virus (HSV) (L.M. Schang et al., *J. Virol.* (1998) 72:5626) and CDK homologs are known to play essential roles in yeast.

Selective CDK inhibitors can be used to ameliorate the effects of various autoimmune disorders. Rheumatoid arthritis, a chronic inflammatory disease, is characterized by synovial tissue hyperplasia. Inhibition of synovial tissue proliferation should minimize inflammation and prevent joint destruction. Expression of the CDK inhibitor protein p16 in synovial fibroblasts has been found to inhibit growth (K. Taniguchi et al., *Nat. Med.* (1999) 5:761-767). Similarly, in a rat model of arthritis, joint swelling was substantially inhibited by treatment with a p16 expressing adenovirus. CDK inhibitors may be effective against other disorders of cell proliferation including psoriasis (characterized by keratinocyte hyperproliferation), glomerulonephritis, and lupus.

Certain CDK inhibitors may be useful as chemoprotective agents through their ability to inhibit cell cycle progression of normal untransformed cells (Chen et al. *J. Natl. Cancer Institute* (2000) 92:1999-2008). Pre-treatment of a cancer patient with a CDK inhibitor prior to the use of cytotoxic agents can reduce the side effects commonly associated with chemotherapy. Normal proliferating tissues are protected from the cytotoxic effects by the action of the selective CDK inhibitor.

Review articles on small molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases have noted the difficulty of identifying compounds that inhibit specific CDK proteins without inhibiting other enzymes. Thus, despite their potential to treat a variety of diseases, no CDK inhibitors are currently approved for commercial use (P.M. Fischer, *Curr. Opin. Drug Discovery* (2001) 4:623-634; D.W. Fry and M.D. Garrett, *Curr. Opin. Oncologic, Endocrine & Metabolic Invest.* (2000) 2:40-59; K.R. Webster and D. Kimball, *Emerging Drugs* (2000) 5:45-59; T.M. Sielecki et al., *J. Med. Chem.* (2000) 43:1-18.).

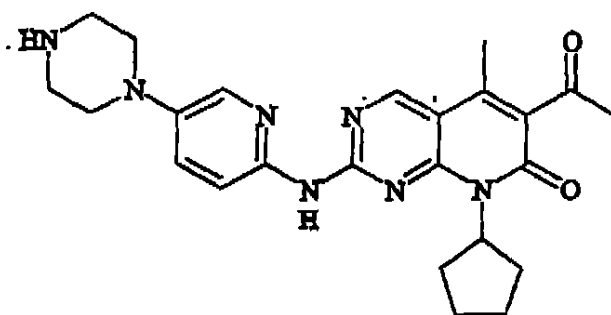
Despite these difficulties, recent studies have identified a number of selective CDK4 inhibitors that, as discussed above, may prove useful in treating cancer—either as anti-cancer agents or as chemoprotective agents—and in treating cardiovascular disorders, such as restenosis and atherosclerosis, diseases caused by infectious agents, and autoimmune disorders, including rheumatoid arthritis. For a disclosure of these selective CDK4 inhibitors, see commonly assigned International Patent Application PCT/IB03/00059, filed January 10, 2003 (the '059 Application), which is herein incorporated by reference in its entirety for all purposes.

The '059 Application discloses a particularly potent and selective CDK4 inhibitor, 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one:

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-3-



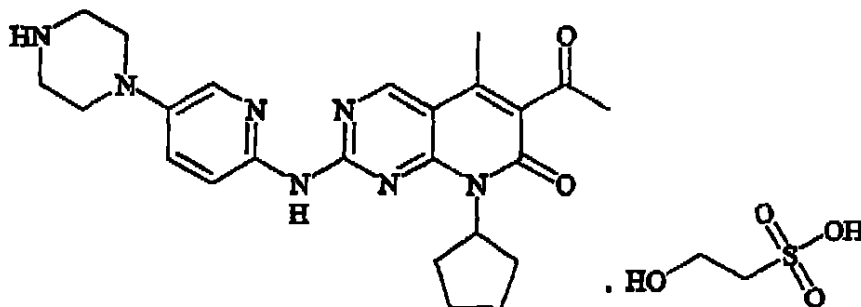
1

In standard enzyme assays the compound of Formula 1 exhibits IC_{50} concentrations for CDK4 and CDK2 inhibition (at 25°C) of 0.011 μ M and > 5 μ M, respectively. For a discussion of standard CDK4 and CDK2 assays for IC_{50} determinations, see D.W. Fry et al., *J. Biol. Chem.* (2001) 16617-16623.

Though the compound of Formula 1 is a potent and selective CDK4 inhibitor, its use in pharmaceutical products presents challenges. For example, the free base has poor water solubility (9 μ g/mL) and exhibits low bioavailability in animal studies. A di-HCl salt of the compound of Formula 1 appears to exhibit adequate water solubility. However, moisture uptake studies reveal that, even at low relative humidity (10 % RH), the di-HCl salt absorbs water in an amount greater than about 2 % of its mass, making it unsuitable for use in a solid drug product. A mono-HCl salt of the compound of Formula 1 is marginally hygroscopic, absorbing more than 2 % of its mass at a relative humidity above 80 %. However, the process for preparing the mono-HCl salt yields partially crystalline drug substance, indicating potential problems with process scale-up. Other salt forms of the compound of Formula 1 are thus needed.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrindo[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is represented by Formula 2:



2

The isethionate salt can exist as one or more polymorphs, including Form A, Form B, and Form D. Each of the polymorphs can be distinguished by its powder X-ray diffraction (PXRD) pattern (diffractogram), or Raman spectrum, or differential scanning calorimetry

12

WO 2005/005426

PCT/TB2004/002152

-4-

(DSC) thermogram, or some combination of PXRD pattern, Raman spectrum, and DSC thermogram. The isethionate salt may be anhydrous, or may contain varying amounts of water or one or more solvents.

Thus, one aspect of the present invention provides a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is designated as Form A, and is characterized by one or more of the following: a powder X-ray diffraction pattern having peaks at 2θ values of about 8.7, 13.6, and 17.8, or a Raman spectrum having peaks at Raman Shift values of about 1600 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 675 cm^{-1} , 470 cm^{-1} , 450 cm^{-1} , and 425 cm^{-1} , or a DSC thermogram having a sharp endotherm at 273°C .

Another aspect of the present invention provides a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is designated as Form B, and is characterized by one or more of the following: a powder X-ray diffraction pattern having peaks at 2θ values of about 5.1, 11.8, 12.1, 12.8, 13.1, and 14.7, a Raman spectrum having peaks at Raman Shift values of about 1600 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 470 cm^{-1} , 450 cm^{-1} , and 425 cm^{-1} , but no substantial peak at 675 cm^{-1} , or a DSC thermogram having a sharp endotherm at 271°C .

A further aspect of the present invention provides a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is designated as Form D, and is characterized by one or more of the following: a powder X-ray diffraction pattern having peaks at 2θ values of about 8.4, 8.9, and 21.9, a Raman spectrum having a peak at a Raman Shift value of about 463 cm^{-1} , or a DSC thermogram having a sharp endotherm at 277°C . For each salt form, the powder X-ray diffraction pattern is obtained using CuK_{α} radiation and the DSC thermogram is obtained using a heating rate of $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

The present invention also provides pharmaceutical dosage forms that include an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one and one or more pharmaceutically acceptable excipients. Useful excipients include disintegrants, binders, diluents, surface-active agents, lubricants, preservatives, anti-oxidants, flavors, colorants, and the like.

The present invention also provides methods of making the isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. One method includes adding a solution of isethionic acid and a first solvent to an aqueous slurry of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, to produce a first mixture. The method also includes freeze-drying the mixture to give an amorphous salt, which is subsequently combined with a second

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-5-

solvent to produce a second mixture that includes the isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.

Another method includes providing a seed crystal of an isethionate salt form of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, and adding the seed crystal to a dispersion of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one and a first solvent to produce a first mixture. The method also includes combining the first mixture with a solution of isethionic acid and a second solvent to produce a second mixture, which includes the isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.

In both of the above methods, the first and second solvents may be the same or different, and are water-miscible solvents, including MeOH, EtOH, and other alcohols. To improve yields, the methods may include heating, cooling, or heating and cooling the second mixture to temperatures above and below room temperature. For instance, the second mixture may be heated to a temperature ranging from about 30°C to about 60°C and subsequently allowed to cool to room temperature. Alternatively, the second mixture may be allowed to stand at room temperature, and subsequently cooled to a temperature at or below about 0°C. Similarly, the second mixture may be heated to a temperature ranging from about 30°C to about 60°C and subsequently cooled to a temperature at or below about 0°C.

Another method includes reacting 4-(6-[6-(1-butoxy-vinyl)-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido [2,3-d]pyrimidin-2-ylamino]-pyridin-3-yl)-piperazine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester with isethionic acid in a solvent and water to give a mixture that includes a di-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. The method optionally includes adding a hindered base to the reaction mixture to generate a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.

The present invention further provides a method of treating a disorder or condition in a mammal, including a human, caused by abnormal cell proliferation, or by viral or fungal infections, or by an autoimmune disease. The method includes administering to the mammal an amount of an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is effective in treating the disorder or condition. Disorders or conditions caused by abnormal cell proliferation include cancer and vascular smooth muscle proliferation associated with atherosclerosis, post-surgical vascular stenosis and restenosis, and endometriosis. Autoimmune diseases include psoriasis, inflammation-like rheumatoid arthritis, lupus, type 1 diabetes, diabetic nephropathy, multiple sclerosis, glomerulonephritis, and organ transplant rejection, including host versus graft disease.

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-6-

The isethionate salt provides significant advantages over the free base (Formula 1) and other salt forms, including mono- and di-HCl addition salts. Compared to the free base, the isethionate salt exhibits over a 20,000-fold improvement in water solubility. Unlike the case of the di-HCl salt, however, the improvement in solubility is not accompanied by a substantial increase in hygroscopicity. Additionally, the isethionate salt is substantially crystalline, and therefore does not suffer from potential scale-up issues associated with the mono-HCl salt. These and other advantages should help alleviate many of the challenges facing development of pharmaceutical products containing the selective CDK4 inhibitor of Formula 1.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The various features, advantages and other uses of the present invention will become more apparent by referring to the following description and drawings in which:

FIG. 1 shows a PXRD pattern of a mono-isethionate salt (Form A) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 2 shows PXRD patterns of a mono-isethionate salt (Form B and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 3 shows a PXRD pattern of a mono-mesylate salt (Form A, Form B, Form C, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 4 shows a PXRD pattern of a di-mesylate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 5 shows a PXRD pattern of a mono-HCl salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 6 shows a PXRD pattern of a di-HCl salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 7 shows Raman spectra of a mono-isethionate salt (Form A, Form B, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, having Raman Shifts ranging from 0 cm^{-1} to 1850 cm^{-1} ;

FIG. 8 shows Raman spectra of a mono-isethionate salt (Form A, Form E, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, having Raman Shifts ranging from 1350 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} ;

FIG. 9 shows Raman spectra of a mono-isethionate salt (Form A, Form B, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, having Raman Shifts ranging from 1100 cm^{-1} to 1350 cm^{-1} ;

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-7-

FIG. 10 shows Raman spectra of a mono-isethionate salt (Form A, Form B, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, having Raman Shifts ranging from 500 cm^{-1} to 850 cm^{-1} ;

FIG. 11 shows Raman spectra of a mono-isethionate salt (Form A, Form B, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, having Raman Shifts ranging from 340 cm^{-1} to 550 cm^{-1} ;

FIG. 12 shows a DSC thermogram of a mono-isethionate salt (Form A) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 13 shows DSC thermograms of a mono-isethionate salt (Form B and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 14 shows DSC thermograms of a mono-mesylate salt (Form A, Form B, Form C, and Form D) of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 15 shows a DSC thermogram of a di-mesylate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 16 shows a DSC thermogram of a di-HCl salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;

FIG. 17 shows water adsorption/desorption isotherms for the free base of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, and

FIG. 18 shows water adsorption/desorption isotherms for various salts of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one including mono-isethionate (Form B and Form D), mono- and di-HCl, mono-mesylate (Form A and Form C), di-mesylate, and mono-tosylate.

DETAILED DESCRIPTION

DEFINITIONS AND ABBREVIATIONS

Unless otherwise indicated, this disclosure uses definitions provided below.

The term "cancer" includes, but is not limited to, the following cancers: cancers of the breast, ovary, cervix, prostate, testis, esophagus, stomach, skin, lung, bone, colon, pancreas, thyroid, biliary passages, buccal cavity and pharynx (oral), lip, tongue, mouth, pharynx, small intestine, colon-rectum, large intestine, rectum, brain and central nervous system, glioblastoma, neuroblastoma, keratoacanthoma, epidermoid carcinoma, large cell carcinoma, adenocarcinoma, adenocarcinoma, adenoma, adenocarcinoma, follicular carcinoma, undifferentiated carcinoma, papillary carcinoma, seminoma, melanoma, sarcoma, bladder carcinoma, liver carcinoma, kidney carcinoma, myeloid disorders, lymphoid disorders, Hodgkin's disease, hairy cells, and leukemia.

WO 2005/005426

PCT/JP2004/002152

-8-

The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to substances, which are within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of patients without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio, and effective for their intended use.

5 The term "treating" refers to reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing a disorder or condition to which such term applies, or to preventing one or more symptoms of such disorder or condition.

The term "treatment" refers to the act of "treating," as defined immediately above.

Table 1 lists abbreviations used through the specification.

10

Table 1. Abbreviations

Abbreviation	Description
aq	aqueous
ACN	acetonitrile
BOC	tert-butoxycarbonyl
DCM	dichloromethane
DSC	differential scanning calorimetry
Et ₃ N	triethylamine
EtOH	ethyl alcohol
h, min, s	hour, minute, second
IPA	isopropyl alcohol
MeOH	methanol
PXRD	powder X-ray diffraction
RH	relative humidity
RT	room temperature, i.e. 20°C—25°C
THF	tetrahydrofuran
mgA/mL	milligrams of active substance per milliliter of solution

The mono-isethionate salt (Formula 2) can exist as one or more polymorphs, including Form A, Form B, and Form D. As indicated above, each of the polymorphs may be distinguished by powder X-ray diffraction (PXRD), or Raman spectroscopy, or differential scanning calorimetry (DSC), or some combination of these characterization methods. The

15 mono-isethionate salt (Formula 2) may be anhydrous, or may contain varying amounts of water or one or more solvents. Furthermore, the mono-isethionate salt (Formula 2) may be substantially pure—i.e., contain at least about 99 wt % of a particular polymorph—or may be a mixture of two or more of the polymorphs (e.g., Form B and Form D, etc.).

20 The free base (Formula 1) is a dibasic compound, which may form both mono- and di-acid addition salts. Its conjugate acid has pK_as of 7.3 and 4.1, so comparatively strong acids are necessary for generating the di-salt. Though it may be possible to form a di-

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-9-

isethionate salt of the compound of Formula 1, the mono-isethionate salt appears to be more useful since it requires less counter ion.

FIG. 1 and FIG. 2 provide PXRD diffractograms for mono-isethionate salt forms of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Formula 2). These forms are designated as Form A in FIG. 1 and Form B and Form D in FIG. 2. To improve readability, the diffractogram of Form D in FIG. 2 has been shifted upward about 700 units. Table 2, below, lists significant PXRD peaks (i.e., those exhibiting peak height to noise ratio greater than 3.5.) for mono-isethionate polymorphs A, B, and D, and provides in underlined font, a subset of characteristic peaks that may be used to distinguish one polymorph from another. The list of characteristic peaks provided in Table 2 is not the only possible list of characteristic peaks. Persons of ordinary skill in the art of polymorph identification may choose other sets of characteristic peaks that will also distinguish one polymorph from another.

For comparison purposes, FIG. 3—FIG. 6 show PXRD diffractograms for, respectively, mono-mesylate, di-mesylate, mono-HCl, and di-HCl salts of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. Although these salts may exist in more than one form, distinct polymorphs have only been identified for the mono-mesylate salt, which FIG. 3 designates as Form A, Form B, Form C, and Form D. To highlight differences among the mono-mesylate salt forms, the diffractograms of Form B, Form C, and Form D in FIG. 3 have been shifted upward by various amounts.

Each of the PXRD patterns shown in FIG. 1—FIG. 6 were obtained on a RIGAKU D/Max 2200 powder X-ray diffractometer using CuK α radiation. The diffractometer was equipped with a fine-focus X-ray tube. During each run, the tube voltage and current were set at 40 kV and 40 mA, respectively, the divergence and scattering slits were set at 0.5°, and the receiving slit was set at 0.3 mm. Diffracted radiation was detected using a NaI scintillation detector. For each of the runs, a θ -2 θ continuous scan of approximately 1°/min (3 s/0.040° step) from 3.0 to 40.0 °2 θ was used. Samples were prepared for analysis by placing them in a silicon-wafer holder. Data were collected using RIGAKU's RIGMEAS software and were analyzed using a proprietary software package developed using the JADE software platform.

For each powder X-ray diffraction measurement, a sample of a salt form was placed into a cavity located on a planar surface of the holder, and a glass slide was used to level the surface of the sample. The holder, which contains the sample, was placed in the diffractometer, and the source of the X-ray beam irradiated the sample, initially at a small angle relative to the planar surface of the holder. The X-ray beam was subsequently moved through an arc in a step-wise manner, which successively increased the angle between the incident beam and the planar surface of the holder. At each step of the scan, the scintillation

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-10-

counter detected the amount of diffracted radiation, which was recorded as a function of 2θ . The instrument software displays the diffracted radiation results of the scan as intensity versus 2θ (FIG. 1—FIG. 6).

Differences in PXRD patterns among separate measurements of the same polymorph may arise for many reasons. Sources of error include variations in sample preparation (e.g. sample height), instrument errors, calibration errors, and operator errors (including errors in determining peak locations). Preferential orientation, i.e., a lack of random orientation of crystals in the PXRD sample, can result in significant differences in relative peak heights. Calibration errors and sample height errors often result in a shift of all of the peaks of the diffractogram in the same direction and by the same amount. Small differences in sample height on a flat holder may lead to large displacements in PXRD peak positions. For a systematic study showing that sample height differences of 1 mm may lead to peak shifts as high as $1^\circ 2\theta$, see Chen et al., *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2001) 26:63.

In many instances, peak shifts among diffraction patterns resulting from systematic error can be eliminated by compensating for the shift (e.g., applying a correction factor to all peak position values) or by recalibrating the diffractometer. Generally, the same techniques can be used to compensate for differences among diffractometers so that PXRD peak positions obtained from two different instruments can be brought into agreement. Furthermore, when these techniques are applied to PXRD measurements from the same or different diffractometers, the peak positions for a particular polymorph will usually agree to within about $\pm 0.2^\circ 2\theta$.

Table 2. Significant PXRD Peaks for Mono-Isethionate Salt Form A, B, and D

Polymorph	Significant Peaks, 2θ
	(Underlined values are characteristic of a particular polymorph)
A	<u>8.7</u> , 12.6, <u>18.5</u> , <u>17.5</u> , 18.8, 19.6, 19.8, 23.0, 24.2
B	<u>6.1</u> , 10.2, <u>11.8</u> , <u>12.1</u> , <u>12.8</u> , <u>13.1</u> , <u>14.7</u> , 15.2, 16.0, 16.6, 17.9, 19.2, 19.7, 21.3, 21.9, 22.6, 23.2, 24.6, 26.8, 28.1, 28.9, 30.0, 30.9, 32.5, 33.0, 32.5, 33.0, 34.2, 35.3, 36.0
D	<u>8.4</u> , <u>8.9</u> , 10.8, 12.6, 14.2, 16.8, 17.9, 18.4, 19.1, 20.0, 20.4, 21.0, <u>21.9</u> , <u>22.6</u> , 23.0, 23.6, 24.6, 26.2, 27.2, 28.7, 29.8, 30.3, 36.4

FIG. 7—FIG. 11 show Raman spectra of the mono-isethionate salt forms of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Formula 2). FIG. 7 shows Raman spectra of mono-isethionate salt Form A, Form B, and Form D for Raman Shifts ranging from 0 cm^{-1} to 1850 cm^{-1} , while FIG. 8—FIG. 11 provide Raman spectra for mono-isethionate salt Form A, Form B, and Form D for Raman Shifts ranging from 1360 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} to 1350 cm^{-1} , 500 cm^{-1} to 850 cm^{-1} , and 340 cm^{-1} to 550 cm^{-1} , respectively. In some of the figures, one or more of the Raman spectra may

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-11-

employ different ordinate scaling (e.g., Form A in FIG. 7, 8, 10, and 11) or different baselines (e.g., Form A and Form B in FIG. 9) or different ordinate scaling and baselines (FIG. 10) to emphasize differences among the mono-isethionate salt forms.

Table 3, below, lists characteristic peaks of the Raman spectra that may be used to distinguish one mono-isethionate salt form from another. As with the PXRD data, the list of characteristic peaks provided in Table 3 is not the only possible list of characteristic peaks, and persons of ordinary skill in the art of polymorph identification may choose other sets of characteristic peaks that will also distinguish one polymorph from another.

The Raman spectra shown in FIG. 7—FIG. 11 were obtained using a KAISER OPTICAL SYSTEMS HOLOLAB Raman microscope and spectrograph. The Raman spectrograph utilized a solid-state diode laser operating at 785 nm, with an output power of approximately 90 mW. The power delivered to the sample through the microscope objective was approximately 27 mW. A thermoelectrically cooled CCD detector was used to detect the Raman signal. Fiber optic cables connecting the Raman microscope and spectrograph were used to guide the laser excitation light and the Raman scattered light to and from the sample, respectively.

To obtain representative Raman spectra, samples of each of the polymorphic forms were probed at multiple locations or spots. For each sample, Raman spectra were obtained at four or five spots, with four replicate spectra at each spot. As is normally the case with solid samples, data for a given polymorphic form exhibited the most variation in peak intensity, and exhibited comparatively little variation in peak position. For each of the forms, Raman shift values (peak positions as a function of wave number) varied by less than 1 cm^{-1} , though as would be expected, peak positions among different forms could vary by more than 1 cm^{-1} . At least some of the variation in peak intensity or peak position is thought to arise from differences in the way the laser light strikes different crystals in the sample.

Table 3. Characteristic Raman Spectra Peaks for Mono-isethionate Salt Form A, B, and D

Peak (cm^{-1})	Peak is characteristic of this polymorph
1600	A and B
1280	A and B
675	A
470	A and B
463	D
450	A and B
425	A and B

Like the run-to-run variation described above, the Raman spectra of a particular polymorph that are obtained using different instruments appear to exhibit little variation (i.e., 1

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-12-

cm⁻¹ or less) in peak position, and comparatively greater variation in peak intensity. (Given that Raman scattering is independent of the excitation wavelength used, peak positions should be about the same between instruments that use different excitation sources. Peak intensities may vary depending on, among other things, the type of detector or optics, the power of the exciting laser, and the sample position.

FIG. 12 and FIG. 13 show DSC thermograms of the mono-isethionate salt forms of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Formula 2) designated as Form A (FIG. 12), and Form B and D (FIG. 13). Additionally, FIG. 14—FIG. 16 show DSC thermograms of the mono-mesylate salt (Form A, B, C, and D), the di-mesylate salt, and the di-HCl salt, respectively. The DSC data were obtained using a TA INSTRUMENTS 2920 Modulated DSC V2.6. Individual polymorph samples were analyzed in vented, sealed aluminum pans using a heating rate of 5°C/min to 350°C and a nitrogen purge of 50 mL/min.

As shown in FIG. 12—FIG. 15, the mono-isethionate salt (Form A, B, and D), the mono-mesylate salt (Form A, B, C, and D), and the di-mesylate salt have distinct melting points, exhibiting sharp endotherms at about 273°C, 271°C, 277°C, 309°C, 307°C, 302°C, 304°C, and 289°C, respectively. In contrast, the di-HCl salt (FIG. 16) possesses a comparatively complex DSC thermogram, which includes broad endotherms between about 40°C and 110°C and between about 160°C and 200°C, which likely indicate loss of moisture and lattice water, respectively. The di-HCl salt DSC trace also exhibits a relatively sharp exotherm starting at about 207°C and a broad endotherm beginning at about 275°C, which probably indicate, respectively, form transformation and melting or decomposition or both

FIG. 17 and FIG. 18 show water adsorption and desorption isotherms (at 25°C) for the free base (Formula 1) and various salts of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, including mono-isethionate (Form B and D), mono- and di-HCl, mono-mesylate (Form A and C), di-mesylate, and mono-tosylate. The water adsorption and desorption data were obtained using a VTI CORPORATION MODEL SGA-100 symmetrical gravimetric analyzer. To obtain a water vapor isotherm, a sample of a polymorph was placed on a microbalance in a sealed environmental chamber, and subsequently heated at a rate of 5°C/min until the temperature in the chamber reached 40°C. To obtain a dry sample weight, the polymorph was allowed to equilibrate at 40°C until the sample experienced a weight change less than 0.0270 wt % in 2 min. Following drying, the sample was cooled to 25°C and subsequently exposed to different humidity levels ranging from 5 or 10 % RH to 90 % RH and from 90 % RH to 10 or 5 % RH, in 10 % RH increments. At each humidity level, the polymorph was allowed to equilibrate until the sample experienced a weight change less than 0.0270 wt % in 2 min. The equilibrium mass at each humidity level

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-13-

was recorded and, along with the dry sample weight, used to generate a plot of weight change versus relative humidity.

Of the compounds shown in FIG. 17 and FIG. 18, only the free base, the mono-isethionate salt (Form B and D), and mono-tosylate salt exhibit less than a 2 % change in mass when exposed to humidity levels ranging from 10 % RH to 90 % RH at 25°C.

Table 4 lists solubility in water of the freebase (its most stable crystal phase according to slurry experiments) and the isethionate salt (Form B, its most stable form according to results of slurry experiments). Since Form B appears to be the most stable isethionate salt form, it should exhibit the lowest water solubility among the isethionate salt forms observed. The other isethionate salt forms were not evaluated for metastable solubility. Aqueous solubility for the isethionate salt was obtained by dissolving the salt in water up to approximately 300 mg/mL, equilibrating for about 48 h after which time some solid was observed, and measuring the aqueous phase salt concentration using HPLC. See Table 5 for a list of HPLC conditions. Aqueous solubility for the freebase was obtained by equilibrating the solid in water for 14 h and measuring the aqueous phase free base concentration using a semi-automated UV-vis method, which utilized a SPECTRMAX PLUS spectrophotometer plate reader.

The data in Table 4 indicates that the water solubility of the mono-isethionate salt (at pH 5.4) is more than 20,000-fold higher than the freebase (at pH 7.9). This large disparity in water solubility cannot be explained by the relatively modest difference in pH of the saturated solutions of the freebase and the mono-isethionate salt. Indeed, the theoretical water solubility of the freebase is only 0.82 mgA/mL at pH 5.4 by Henderson-Hasselbalch calculation (using free base solubility 0.0092 mg/mL at pH 7.9 and pK_a s 7.3 and 4.1). Seeding an aqueous solution of the mono-isethionate salt prepared at 117 mgA/mL, pH 5.4 (supersaturated with respect to free base) with crystals of the freebase did not cause precipitation. Instead, the seeds dissolved, indicating some ability of the isethionate ion to solubilize the freebase in water.

Table 4. Water Solubility of the Free Base and Isethionate Salt (Form B)

Sample	Solubility	Equilibration Time	
	mgA/mL	Final pH	h
Free base	0.009	7.9	14
Isethionate	213	5.4	48

Table 5. General HPLC Conditions for Water Solubility Measurements

Control Variable	Value
Column Flow Rate	1 mL/min
Stop Time	45 min
Solvent A	10 mM Acetate, pH 5.7

-14-

Control Variable	Value
Solvent B	ACN
Solvent A/Solvent B (v/v)	
0 min	80/20
30 min	25/75
35 min	25/75
36 min	80/20
45 min	80/20
Detection Wavelength	260 nm
Column Injection Volume	10 µL
Column Temperature	25°C
Column Type (YMC PAC PRO)	C18 150 x 4.6 mm, 3µ particle size

The solubility of the isethionate salt in normal saline is 0.58 mgA/mL, which is much less than its water solubility, and is very close to the theoretical value 0.43 mgA/mL (Henderson-Hasselbalch calculation) at the final pH of this solution (pH 5.66). In normal saline, the surprising solubilizing power of the isethionate ion essentially disappears and the compound solubility behaves more like a typical basic compound.

The isethionate salt can be prepared using a number of techniques. For example, in one method, a solution of isethionic acid and a first solvent is admixed with an aqueous slurry of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. The mixture is filtered to remove any solids, and the resulting filtrate is freeze-dried (lyophilized) to give an amorphous isethionate salt. The amorphous salt is converted to a crystalline form by dissolving it in a second solvent, which may be accompanied by heating to promote complete dissolution. The resulting solution is subsequently cooled to RT or less to precipitate a crystalline form of the salt, which can be isolated via filtration and then dried in a vacuum oven.

The method generally employs stoichiometric (i.e., molar ratios of 1:1 or 2:1) or near stoichiometric amounts of isethionic acid and 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. The first and second solvents may be the same or different, and are typically water-miscible solvents, including alcohols such as MeOH and EtOH. The amount of heating necessary to dissolve the amorphous salt in the second solvent will depend on the solvent used, but the temperature of the mixture is typically in the range of about 30°C to about 60°C, and is normally in the range of about 30°C to about 50°C. In some cases, the temperature of the mixture is in the range of about 30°C to about 40°C or about 35°C to about 40°C.

In another method, the free base (Formula 1) is dispersed (slurried) in a first solvent and is seeded with a crystalline isethionate salt form. The resulting mixture is admixed with a

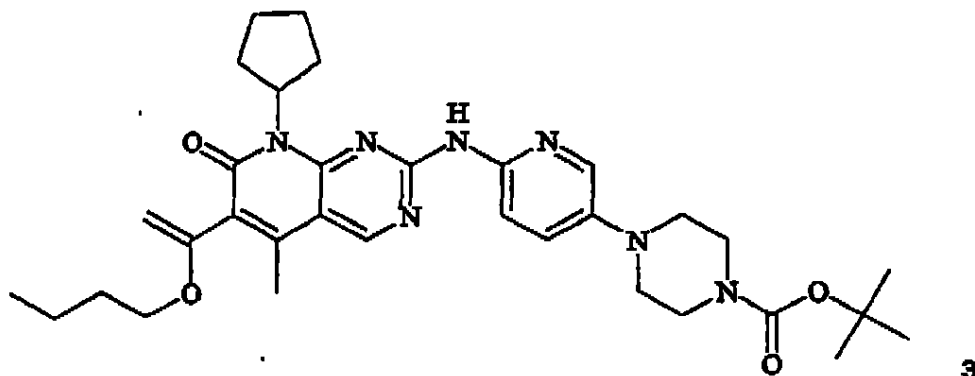
WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-15-

solution of isethionic acid and a second solvent. Typically, the isethionic acid solution is added in multiple portions over a period of time. The resulting slurry or dispersion is stirred at RT or above, usually at a temperature greater than about 35°C or 40°C. To improve yield, the resulting mixture can be cooled to a temperature below about 0°C, which precipitates additional isethionate salt crystals. The isethionate salt crystals that can be isolated via filtration and then dried in a vacuum oven. Like the method described above, this technique employs stoichiometric or near stoichiometric amounts of isethionic acid and 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. In addition, the first and second solvents may be the same or different, and are typically water-miscible solvents, including alcohols such as MeOH and EtOH. Compared to the previously described process, this method often results in improved yields and better (e.g., larger, more uniform) crystals.

Another method bypasses the free base (Formula 1) and generates the isethionate salt directly from a protected process intermediate. The method includes reacting an *N*-BOC protected compound of Formula 3,



with about 3.5 equivalents (or more) of isethionic acid in a first solvent and water, which removes the BOC protecting group and unmasks an acetyl group to give a di-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one. The reaction can be carried out at room temperature or higher, and is often carried out at a temperature ranging from about 30°C to about 60°C. To this reaction mixture is added a hindered base (e.g., Et₃N) in a second solvent, which forms a salt with the isethionic acid that is soluble in the reaction mixture. The amount of base added is sufficient to maintain—in the presence of the di-isethionate salt—a slight excess of free isethionic acid in the reaction mixture. For example, if 3.5 equivalents of isethionic acid were reacted with the BOC-protected compound of Formula 3, about 1.45 equivalents of the hindered base could be used, resulting in about 0.05 equivalents excess of the free isethionic acid. If desired, the di-isethionate salt can be isolated by filtration.

24

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-16-

To obtain a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, additional base is added over an extended period of time (e.g., dropwise) to ensure formation of the requisite mono-isethionate salt form (e.g., Form B). Adding the hindered base too quickly may cause formation of other, metastable polymorphs. To improve yield, the resulting slurry can be cooled to a temperature of about 5°C or below, and then filtered and dried. As in the methods described above, the first and second solvents may be the same or different, and are water-miscible solvents, including alcohols such as MeOH and EtOH.

The other disclosed salt forms—e.g., mono- or di-HCl, mesylate, or tosylate salts—can be prepared in a similar manner to the methods described above for the isethionate salt (Formula 2).

The disclosed compounds (Formula 1 and salts) embrace all pharmaceutically acceptable isotopic variations. An isotopic variation is a compound in which at least one atom is replaced by an atom having the same atomic number, but an atomic mass different from the atomic mass usually found in nature. Useful isotopes include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulfur, fluorine, and chlorine. Exemplary isotopes thus include, without limitation, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , and ^{36}Cl .

Substitution of the disclosed compounds with isotopes such as deuterium, i.e. ^2H , may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased in vivo half-life or reduced dosage requirements, and hence may be more useful in some circumstances. In addition, certain isotopic variations, for example, those incorporating a radioactive isotope, are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. The radioactive isotopes tritium, i.e. ^3H , and carbon-14, i.e. ^{14}C , are particularly useful for this purpose in view of their ease of incorporation and ready means of detection.

Isotopic variations of the disclosed compounds can generally be prepared by conventional techniques known to those skilled in the art or by processes analogous to those described in the accompanying Examples using appropriate isotopic variations of suitable reagents. Pharmaceutically acceptable solvates of the disclosed compounds include those in which the solvent of crystallization may be isotopically substituted, e.g. D_2O , d_6 -acetone, d_4 -DMSO.

The disclosed compounds (Formula 1 and salts) may be administered as crystalline or amorphous products. They may be obtained, for example, as solid plugs, powders, or films by methods such as precipitation, crystallization, freeze-drying, spray drying, or evaporative drying. Microwave or radio frequency drying may be used for this purpose.

The disclosed compounds may be administered alone or in combination with other drugs and will generally be administered as a formulation in association with one or more pharmaceutically acceptable excipients. The term "excipient" describes any ingredient other

WO 2005/005126

PCT/IB2004/002152

-17-

than the compounds represented by Formula 1 and its salts. The choice of excipient will to a large extent depend on the particular mode of administration.

The disclosed compounds may be administered orally. Oral administration may involve swallowing, so that the compound enters the gastrointestinal tract, or buccal or sublingual administration may be employed by which the compound enters the blood stream directly from the mouth.

Formulations suitable for oral administration include solid formulations such as tablets, capsules containing particulates, liquids, or powders, lozenges (including liquid-filled), chews, multi- and nano-particulates, gels, solid solution, liposome, films (including muco-adhesive), ovules, sprays and liquid formulations. Liquid formulations include suspensions, solutions, syrups and elixirs. Such formulations may be employed as fillers in soft or hard capsules and typically comprise a carrier, for example, water, EtOH, polyethylene glycol, propylene glycol, methylcellulose, or a suitable oil, and one or more emulsifying agents and/or suspending agents. Liquid formulations may also be prepared by the reconstitution of a solid, for example, from a sachet.

The disclosed compounds may also be used in fast-dissolving, fast-disintegrating dosage forms such as those described in Liang and Chen, *Expert Opinion In Therapeutic Patents* (2001) 11(5):981-986.

For tablet dosage forms, depending on dose, the drug may make up from 1 wt % to 80 wt % of the dosage form, more typically from 5 wt % to 60 wt % of the dosage form. In addition to the drug, tablets generally contain a disintegrant. Examples of disintegrants include sodium starch glycolate, sodium carboxymethyl cellulose, calcium carboxymethyl cellulose, croscarmellose sodium, crospovidone, polyvinylpyrrolidone, methylcellulose, microcrystalline cellulose, lower alkyl-substituted hydroxypropyl cellulose, starch, pregelatinized starch, and sodium alginate. Generally, the disintegrant will comprise from 1 wt % to 25 wt %, preferably from 5 wt % to 20 wt % of the dosage form.

Binders are generally used to impart cohesive qualities to a tablet formulation. Suitable binders include microcrystalline cellulose, gelatin, sugars, polyethylene glycol, natural and synthetic gums, polyvinylpyrrolidone, pregelatinized starch, hydroxypropyl cellulose, and hydroxypropyl methylcellulose. Tablets may also contain diluents, such as lactose (monohydrate, spray-dried monohydrate, anhydrous and the like), mannitol, xylitol, dextrose, sucrose, sorbitol, microcrystalline cellulose, starch, and dibasic calcium phosphate dihydrate.

Tablets may also optionally include surface-active agents, such as sodium lauryl sulfate and polysorbate 80, and glidants such as silicon dioxide and talc. When present, surface-active agents may comprise from 0.2 wt % to 5 wt % of the tablet, and glidants may comprise from 0.2 wt % to 1 wt % of the tablet.

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-18-

Tablets also generally contain lubricants such as magnesium stearate, calcium stearate, zinc stearate, sodium stearyl fumarate, and mixtures of magnesium stearate with sodium lauryl sulfate. Lubricants generally comprise from 0.25 wt % to 10 wt %, preferably from 0.5 wt % to 3 wt % of the tablet. Other ingredients may include preservatives, anti-oxidants, flavors, and colorants.

Tablet blends may be directly compressed to form tablets. Tablet blends or portions of blends may alternatively be wet-, dry-, or melt-granulated, melt congealed, or extruded before tableting. The final formulation may comprise one or more layers and may be coated or uncoated. Exemplary tablets contain up to about 80 % drug, from about 10 wt % to about 90 wt % binder, from about 0 wt % to about 85 wt % diluent, from about 2 wt % to about 10 wt % disintegrant, and from about 0.25 wt % to about 10 wt % lubricant. For additional details concerning the formulation of tablets, see H. Lieberman and L. Lachman, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Vol. 1 (1980).

Solid formulations for oral administration may be formulated to be immediate and/or modified release. Modified release formulations include delayed-, sustained-, pulsed-, controlled-, targeted-, and programmed-release. For a general description of suitable modified release formulations, see US Patent No. 6,108,864. For details of other useful release technologies, such as high energy dispersions and osmotic and coated particles, see Verma et al, *Pharmaceutical Technology On-line* (2001) 25(2):1-14. For a discussion of the use of chewing gum to achieve controlled release, see WO 00/35298.

The disclosed compounds (Formula 1 and salts) may also be administered directly into the blood stream, into muscle, or into an internal organ. Suitable means for parenteral administration include intravenous, intra-arterial, intraperitoneal, intrathecal, intraventricular, intraurethral, intrasternal, intracranial, intramuscular, and subcutaneous. Suitable devices for parenteral administration include needle (including micro-needle) injectors, needle-free injectors and infusion techniques.

Parenteral formulations are typically aqueous solutions which may contain excipients such as salts, carbohydrates, and buffering agents (preferably to a pH of from 3 to 9), but for some applications, they may be more suitably formulated as a sterile non-aqueous solution or as a dried form to be used in conjunction with a suitable vehicle such as sterile, pyrogen-free water. The preparation of parenteral formulations under sterile conditions, for example, by lyophilization, may readily be accomplished using standard pharmaceutical techniques well known to those skilled in the art.

The solubility of the disclosed compounds used in the preparation of parenteral solutions may be increased by the use of appropriate formulation techniques, such as the incorporation of solubility-enhancing agents. Formulations for parenteral administration may be formulated to be immediate and/or modified release as described above. Thus the

27

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-19-

disclosed compounds may be formulated in a more solid form for administration as an implanted depot providing long-term release of the active compound.

The compounds of the invention may also be administered topically to the skin or mucosa, either dermally or transdermally. Typical formulations for this purpose include gels, hydrogels, lotions, solutions, creams, ointments, dusting powders, dressings, foams, films, skin patches, wafers, implants, sponges, fibers, bandages, and microemulsions. Liposomes may also be used. Typical carriers include alcohol, water, mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, glycerin, polyethylene glycol and propylene glycol. Topical formulations may also include penetration enhancers. See, for example, Finnin and Morgan, *J Pharm Sci* (1999) 88(10):955-958.

Other means of topical administration include delivery by iontophoresis, electroporation, phonophoresis, sonophoresis and needle-free (e.g. POWDERJECT) or micro-needle injection. Formulations for topical administration may be formulated to be immediate and/or modified release as described above.

The disclosed compounds can also be administered intranasally or by inhalation, typically in the form of a dry powder (either alone, as a mixture, for example, in a dry blend with lactose, or as a mixed component particle, for example, mixed with phospholipids) from a dry powder inhaler or as an aerosol spray from a pressurized container, pump, spray, atomizer (preferably an atomizer using electrohydrodynamics to produce a fine mist), or nebulizer, with or without the use of a suitable propellant, such as dichlorofluoromethane. The pressurized container, pump, spray, atomizer, or nebulizer contains a solution or suspension, which comprises the active compound, an agent for dispersing, solubilizing, or extending release of the active compound (e.g., EtOH or aqueous EtOH), one or more solvents, which serve as a propellant, and an optional surfactant, such as sorbitan trioleate or an oligolectic acid.

Prior to use in a dry powder or suspension formulation, the drug product is micronized to a size suitable for delivery by inhalation (typically less than 5 microns). This may be achieved by any appropriate comminuting method, such as spiral jet milling, fluid bed jet milling, supercritical fluid processing to form nanoparticles, high pressure homogenization, or spray drying.

Capsules, blisters and cartridges (made, for example, from gelatin or hydroxypropylmethyl cellulose) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the active compound, a suitable powder base such as lactose or starch, and a performance modifier such as L-leucine, mannitol, or magnesium stearate. The lactose may be anhydrous or, preferably, monohydrated. Other suitable excipients include dextran, glucose, maltose, sorbitol, xylitol, fructose, sucrose and trehalose.

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-20-

A suitable solution formulation for use in an atomizer using electrohydrodynamics to produce a fine mist may contain from 1 µg to 20 mg of the compound of the invention per actuation and the actuation volume may vary from 1 µl to 100 µl. A typical formulation may comprise a compound of Formula 1 or Formula 2, propylene glycol, sterile water, EtOH, and NaCl. Alternative solvents, which may be used instead of propylene glycol, include glycerol and polyethylene glycol.

Formulations for inhaled/intranasal administration may be formulated to be immediate and/or modified release using, for example, poly(DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA). Suitable flavors, such as menthol and levomenthol, or sweeteners, such as saccharin or saccharin sodium, may be added to formulations intended for inhaled/intranasal administration.

In the case of dry powder inhalers and aerosols, the dosage unit is determined by means of a valve that delivers a metered amount. Units in accordance with the invention are typically arranged to administer a metered dose or "puff" containing from 100 to 1000 µg of the active pharmaceutical ingredient. The overall daily dose will typically be in the range 100 µg to 10 mg which may be administered in a single dose or, more usually, as divided doses throughout the day.

The active compounds may be administered rectally or vaginally, for example, in the form of a suppository, pessary, or enema. Cocoa butter is a traditional suppository base, but various alternatives may be used as appropriate. Formulations for rectal/vaginal administration may be formulated to be immediate and/or modified release as described above.

The disclosed compounds may also be administered directly to the eye or ear, typically in the form of drops of a micronized suspension or solution in isotonic, pH-adjusted, sterile saline. Other formulations suitable for ocular and aural administration include ointments, biodegradable (e.g. absorbable gel sponges, collagen) and non-biodegradable (e.g. silicone) implants, wafers, lenses and particulate or vesicular systems, such as niosomes or liposomes. A polymer such as cross-linked polyacrylic acid, polyvinylalcohol, hyaluronic acid, a cellulosic polymer (e.g., hydroxypropylmethylcellulose, hydroxyethylcellulose, or methyl cellulose), or a heteropolysaccharide polymer (e.g., gellan gum), may be incorporated together with a preservative, such as benzalkonium chloride. Such formulations may also be delivered by iontophoresis. Formulations for ocular/aural administration may be formulated to be immediate and/or modified release as described above.

The disclosed compounds may be combined with soluble macromolecular entities such as cyclodextrin or polyethylene glycol-containing polymers to improve their solubility, dissolution rate, taste masking, bioavailability and/or stability. Drug-cyclodextrin complexes, for example, are found to be generally useful for most dosage forms and administration

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-21-

routes. Both inclusion and non-inclusion-complexes may be used. As an alternative to direct complexation with the drug, the cyclodextrin may be used as an auxiliary additive, i.e. as a carrier, diluent, or solubilizer. Alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins are commonly used for these purposes. See, for example, International Patent Applications WO 91/11172, WO 94/02518, and WO 98/55148.

The therapeutically effective dose of the compounds of Formula 1, Formula 2 or other salts will vary from approximately 0.01 mg/kg to approximately 100 mg/kg of body weight per day. Typical adult doses will be approximately 0.1 mg to approximately 3000 mg per day. The quantity of active component in a unit dose preparation may be varied or adjusted from approximately 0.1 mg to approximately 500 mg, preferably from about 0.6 mg to 100 mg according to the particular application and the potency of the active component. The composition can, if desired, also contain other compatible therapeutic agents. A subject in need of treatment is administered a dosage of about 0.6 to about 500 mg per day, either singly or in multiple doses over a 24-hour period. Such treatment may be repeated at successive intervals for as long as necessary.

EXAMPLES

The following examples are intended to be illustrative and non-limiting, and represent specific embodiments of the present invention.

EXAMPLE 1

20 Preparation of 4-[6-(8-bromo-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino)-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester

A suspension of 6-bromo-8-cyclopentyl-2-methanesulfinyl-5-methyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (10.00 g, 0.027 mol, prepared as in Example 6 of WO 01/707041, which is incorporated herein by reference) and 10.37 g (0.0373 mol) of 4-(6-amino-pyridin-3-yl)-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester in toluene (100 mL) was heated under nitrogen in an oil bath for 7 hours. Thin layer chromatography (SiO₂, 10 % MeOH/DCM) indicated the presence of both starting materials. The suspension was heated under reflux for an additional 18 hours. The resulting suspension was cooled to RT and filtered to give 4-[6-(8-bromo-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino)-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (5.93 g, 38 %). Melting point > 250°C. MS (APCI) M⁺+1: calc'd, 584.2, found, 584.2.

EXAMPLE 2

35 Preparation of 4-[6-(8-cyclopentyl-6-(1-ethoxy-vinyl)-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino)-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester

A suspension of 4-[6-(6-bromo-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino)-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (5.93 g, 0.0110 mol, prepared as in Example 1), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (1.40 g, 0.00121

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-22-

mol), and tributyl(1-ethoxyvinyl)tin (5.32 mL, 0.0157 mol) in toluene (30 mL) was heated under reflux for 3.5 hours. The mixture was cooled and filtered to give a solid. Purification of the solid by silica gel chromatography using a gradient of 5 %-66 % ethyl acetate/hexane over 15 minutes gave 4-{6-[8-cyclopentyl-6-(1-ethoxy-vinyl)-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-
5 d]pyrimidin-2-ylamino]-pyridin-3-yl}-piperazine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester as a yellow foam (4.50 g, 78 %). MS (APCI) $M^+ + 1$: calc'd 576.2, found, 576.3.

EXAMPLE 3

Preparation of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one hydrochloride

10 Hydrogen chloride gas was bubbled into an ice-bath cooled solution of 4-{6-[8-cyclopentyl-6-(1-ethoxy-vinyl)-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino]-pyridin-3-yl}-piperazine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (4.50 g, 0.00783 mol, prepared as in Example 2) in DCM (100 mL). The resulting suspension was stoppered and stirred at RT overnight, then diluted with diethyl ether (200 mL). The solid was collected by filtration,
15 washed with diethyl ether, and dried to give the hydrochloride salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one as a yellow solid (4.01 g, 92 %). Melting point 200°C. HPLC, C18 reverse phase, 10 %-85 % gradient of 0.1 %TFA/CH₃CN in 0.1 % TFA/H₂O during 22 minutes: 99.0 % at 11.04 minutes. MS (APCI) $M^+ + 1$: calc'd, 448.2, found, 448.3. Anal. calc'd for C₂₄H₂₉N₇O₂·2.4 H₂O·1.85 HCl: C, 51.64 H, 6.44; N, 17.56, Cl (total), 11.75. Found: C, 51.31; H, 6.41; N, 17.20; Cl (total), 12.11.
20

EXAMPLE 4

Preparation of a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form B)

To a slurry of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-
25 8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (7.0 g, 15.64 mmol, prepared as in Example 3 following contact with NaOH) dispersed in 250 mL of water was added drop-wise 30 mL of a 0.62 M solution of isethionic acid in MeOH (15.64 mmol) to a pH of 5.2. The solution was filtered through a glass filter (fine) and the clear solution was freeze-dried to give 9.4 g of the amorphous salt. The amorphous salt (3.16 g) was mixed with 25 mL of MeOH and after
30 almost complete dissolution a new precipitate formed. Another 25 mL of MeOH was added and the mixture was stirred at 48°C to 49°C for four hours. The mixture was slowly cooled to 32°C and put in a cold room (+4°C) overnight. A sample was taken for PXRD, which indicated formation of Form B. The mixture was filtered and the precipitate was dried overnight at 50°C in a vacuum oven. This furnished 2.92 g of the mono-isethionate salt of the
35 compound of Formula 1 in 92 % yield. HPLC – 99.25 %, PXRD – Form B, CHNS, H-NMR were consistent with the structure.

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-23-

EXAMPLE 5

Preparation of a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form B)

MeOH (100 mL) was placed in a 250 mL flask equipped with a mechanical stirrer, thermocouple/controller, condenser, and heating mantle and preheated to 35°C. An amorphous isethionate salt (2 g, prepared as in Example 4) was slowly added in three even portions with a 25 min to 30 min interval between the additions. The reaction mixture was stirred overnight at 35°C and subsequently cooled. A sample was filtered and examined by PXRD. It was pure Form B. The whole reaction mixture was then used as Form B seeds in a larger scale experiment.

EXAMPLE 6

Preparation of a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form B)

MeOH (50 mL) was placed in a 250 mL flask equipped with a magnetic stirrer, condenser, thermocouple/controller, and heating mantle, and preheated to 40°C. An amorphous isethionate salt (1 g, prepared as in Example 4) was slowly added in three even portions with 30 min interval between the portions and then stirred overnight at 40°C. The reaction was monitored by in-situ Raman spectroscopy. The sample was taken, filtered and analyzed by PXRD. It was pure Form B by PXRD and Raman spectroscopy. The mixture was cooled to 25°C at a rate of 3°C/h, cooled to -10°C, filtered, and vacuum dried to furnish 0.85 g of the Form B crystalline product.

EXAMPLE 7

Preparation of a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form B)

The free base (Formula 1, 0.895 mg, 2 mmol) was mixed with 10 mL of MeOH and seeded with 33 mg of a mono-isethionate salt of the compound of Formula 1 (Form B). Then 5.6 mL of a 0.375 M solution of isethionic acid in MeOH (2.1 mmol) was added in 10 even portions over 75 min time period. The mixture was stirred for an additional hour and a sample was taken for PXRD analysis. It confirmed formation of crystalline Form B. The mixture was stirred at RT overnight and another PXRD was taken. There was no change in the crystal form. The mixture was cooled in a refrigerator at -8°C overnight, filtered, and dried at 50°C in a vacuum oven to give 1.053 g (91.8 % of theory) of the above-named compound (Form B). HPLC - 99.8 %, CHNS, H-NMR, IR are consistent with the structure, PXRD - Form B.

WO 2005/005426

PCT/TB2004/002152

-24-

EXAMPLE 8

Preparation of a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form A)

An amorphous isethionate salt (47 mg, prepared as in Example 4) was mixed with 4 mL of EtOH in a 15 mL flask equipped with a magnetic stirrer, thermocouple and condenser. The mixture was heated to reflux, which resulted in the formation of a nearly clear solution. After refluxing for 10-15 min, the mixture became cloudy. It was slowly cooled to 50°C and was seeded at 69°C with Form A. The mixture was held at 50°C for 5 h and was allowed to cool to RT overnight. The mixture was subsequently cooled to 1°C with an ice bath, held for 1.5 h, filtered, washed with 0.5 mL of cold EtOH, air-dried, and then dried in a vacuum oven at 70°C overnight to furnished 38.2 mg of a fine crystalline material. The crystalline material was found to be mono-isethionate salt Form A by PXRD. ¹H-NMR was consistent for the mono-isethionate salt and indicated the presence of residual EtOH ca. 5.9 mol % or 0.6 wt %.

EXAMPLE 9

Preparation of a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form D)

An amorphous isethionate salt (9.0 g, prepared as in Example 4) was mixed with 300 mL of MeOH, stirred and heated to 63.8°C (at reflux). To the slightly cloudy mixture was added two 50-mL portions of MeOH. The hot mixture was filtered into a 2-L flask equipped with a mechanical stirrer. The mixture was briefly heated to reflux and then cooled to 60°C. IPA (100 mL) was added to the mixture. The mixture was again heated to 60°C and an additional 110 mL of IPA was added. A precipitate started to form at 59.7°C. The mixture was reheated to 67.5°C, cooled to 50°C, and held overnight. A sample was taken the next morning for PXRD analysis. The mixture was cooled to 25°C at a rate of 3°C/h and another PXRD sample was taken when the mixture reached 28°C. The mixture was allowed to cool to RT overnight. A precipitate was collected and dried in a vacuum oven at 65°C and 50 Torr. The procedure produced 7.45 g (82.8 % yield) of the crystalline compound (Form D by PXRD analysis). Previously analyzed samples were also Form D. HPLC showed 98.82 % purity and CHNS microanalysis was within +/- 0.4 %. A slurry of isethionate salt Form A, B, and D in MeOH yielded substantially pure Form B in less than three days.

EXAMPLE 10

Preparation of isethionic acid (2-hydroxy-ethanesulfonic acid)

A 5-L, four-necked, round-bottomed flask, equipped with mechanical stirrer, thermocouple, gas sparger, and an atmosphere vent through a water trap was charged with 748 g (5.05 mol) of sodium isethionate (ALDRICH), and 4 L of IPA. The slurry was stirred at RT. An ice bath was used to keep the internal temperature below 50°C as 925 g (25.4 mol) of hydrogen chloride gas (ALDRICH) was sparged into the system at a rate such that it

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-25-

dissolved as fast as it was added (as noted by lack of bubbling through the water trap). Sufficient HCl gas was added until the system was saturated (as noted by the start of bubbling through the water trap). During the addition of HCl, the temperature rose to 45°C. The slurry was cooled to RT and filtered over a coarse-fritted filter. The cake was washed with 100 mL of IPA and the cloudy filtrate was filtered through a 10-20µ filter. The resulting clear, colorless filtrate was concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator, while keeping the bath temperature below 50°C. The resulting 1.07 kg of clear, light yellow oil was diluted with 50 mL of tap water and 400 mL of toluene and concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator for three days, while keeping the bath temperature below 50°C. The resulting 800 g of clear, light yellow oil was diluted with 600 mL of toluene and 250 mL of IPA and concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator for 11 days, keeping the bath temperature below 50°C. The resulting 713 g of clear, light yellow oil was titrated at 81 wt % (580 g, 91.1% yield) containing 7.9 wt % water and 7.5 wt % IPA.

EXAMPLE 11

Preparation of 4-[6-[6-(1-butoxy-vinyl)-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino]-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester

A 5-L, three-necked, round-bottomed flask, equipped with a mechanical stirrer, a thermocouple, and a nitrogen inlet/outlet vented through a silicone oil bubbler was placed under a nitrogen atmosphere and charged with 4-[6-(6-bromo-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-ylamino)-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester (300 g, 0.61 mol, prepared as in Example 2), butyl vinyl ether (164g, 1.54 mol, ALDRICH), *n*-butanol (1.5 L, ALDRICH), and diisopropyl ethylamine (107 mL, 0.62 mol, ALDRICH). The slurry was placed under approximately 50 Torr vacuum and then refilled with nitrogen 3 times. To this was added 8.3g (0.01 mol) bis-(diphenylphosphinoferrocene) palladium dichloride dichloromethane (JOHNSON MATTHEY, Lot 077598001) and the resulting slurry was purged an additional three times as described above. The mixture was then heated to 95°C and stirred for 20 h. The resulting thin red slurry was diluted with 2 L of heptane and cooled to approximately 5°C. At this temperature, 400mL saturated aqueous potassium carbonate was added and the mixture was filtered and rinsed with 250 mL of heptane. After drying in an oven for 16 h at 45°C, 231.7 g (75 % yield) of the title compound was obtained as a yellow solid.

EXAMPLE 12

Preparation of a mono-sulfonate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Form B)

A 22-L, three-necked, round-bottomed flask, equipped with a mechanical stirrer, a thermocouple, and a nitrogen inlet/outlet vented through a silicone oil bubbler was placed under a nitrogen atmosphere and charged with 4-[6-[6-(1-butoxy-vinyl)-8-cyclopentyl-5-

324

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-26-

5 methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido [2,3-d]pyrimidin-2-ylamino-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid tert-butyl ester (725 g, 1.20 mol, prepared as in Example 11) and MeOH (14 L). The slurry was stirred at RT as it was charged with a solution of isethionic acid (530 g, 4.20 mol, prepared as in Example 10), MeOH (1.5 L), and water (70 mL, 3.89 mol). The
10 resulting slurry was heated to 55°C over 30 minutes and then stirred at 55°C for 30 minutes. A solution of 175 g (1.73 mol) of Et₃N (ALDRICH) in 200 mL of MeOH was charged to the slurry as it was cooled to 30°C. The slurry was held at 30°C as a solution of 128 g (1.26 mol) of Et₃N in 2 L of MeOH was added dropwise over 6 hours. The resulting slurry was sampled to determine crystal form (Form B). The slurry was cooled and held at 5°C for 15 minutes and
15 was subsequently filtered through a coarse-fritted filter. The resulting filter cake was washed with multiple washes of 200 mL of cold MeOH. The solid product was dried at 55°C under vacuum to yield 710 g (91 % yield) of the title compound as yellow crystals.

It is to be understood that the above description is intended to be illustrative and not restrictive. Many embodiments will be apparent to those of skill in the art upon reading the
15 above description. The scope of the invention should, therefore, be determined not with reference to the above description, but should instead be determined with reference to the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled. The disclosures of all articles and references, including patents, patent applications, and patent publications, are incorporated herein by reference in their entirety and for all purposes.

35

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-27-

CLAIMS

1. An isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.
2. The isethionate salt of claim 1 comprising a mono-isethionate salt of Form A.
- 5 3. The isethionate salt of claim 1 comprising a mono-isethionate salt of Form B.
4. The isethionate salt of claim 1 comprising a mono-isethionate salt of Form D.
5. A pharmaceutical dosage form comprising an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one and one or more pharmaceutically acceptable excipients.
- 10 6. A method of making a crystalline isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, the method comprising:
 - combining a solution of isethionic acid and a first solvent with a dispersion of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one and water to produce a first mixture;
 - 15 freeze-drying the first mixture to give an amorphous salt;
 - mixing the amorphous salt with a second solvent to produce a second mixture that includes a crystalline isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, the second solvent being the same as or different than the first solvent; and
 - 20 optionally heating the second mixture, cooling the second mixture, or heating and cooling the second mixture.
7. A method of making an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one comprising:
 - 25 providing a seed crystal of an isethionate salt form of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one;
 - adding the seed crystal to a dispersion of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one and a first solvent to produce a first mixture;
 - 30 combining the first mixture with a solution of isethionic acid and a second solvent to produce a second mixture that includes the isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one; and
 - optionally heating the second mixture, cooling the second mixture, or heating and cooling the second mixture.
- 35 8. The method of claims 6 or 7, wherein the first and second solvents are water miscible.

86

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-28-

9. The method of claims 6 or 7, wherein the first and second solvents are alcohols.
10. The method of claims 6 or 7, wherein the first and second solvents are MeOH.
- 6 11. The method of claims 6 or 7, wherein the first mixture or the second mixture, respectively, is produced by combining approximately equimolar amounts of isethionic acid and 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.
- 10 12. The method of claim 6 or 7, further comprising agitating the second mixture at a temperature ranging from about 30°C to about 60°C.
13. The method of claim 6 or 7, further comprising cooling the second mixture to a temperature at or below about 0°C.
14. A method of making an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, the method comprising:
- 15 reacting 4-[6-[6-(1-butoxy-vinyl)-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido [2,3-d]pyrimidin-2-ylamino]-pyridin-3-yl]-piperazine-1-carboxylic acid *tert*-butyl ester with isethionic acid in a first solvent and water to give a mixture that includes a di-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.
- 20 15. The method of claim 14, further comprising adding a hindered base to the reaction mixture to give a mono-isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one.
16. A method of treating a disorder or condition in a mammal, including a human, caused by abnormal cell proliferation, the method comprising administering to the mammal an amount of an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is effective in treating the disorder or condition.
- 25 17. The method of claim 16 wherein the disorder or condition is vascular smooth muscle proliferation associated with atherosclerosis, postsurgical vascular stenosis and restenosis, or endometriosis.
- 30 18. The method of claim 16 wherein the abnormal cell proliferation is cancer.
19. A method of treating a disorder or condition in a mammal, including a human, caused by viral or fungal infections, the method comprising administering to the mammal an amount of an isethionate salt of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is effective in treating the disorder or condition.
- 35 20. A method of treating an autoimmune disease in a mammal, including a human, the method comprising administering to the mammal an amount of an isethionate salt

37

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

-29-

of 6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-2-(5-piperazin-1-yl-pyridin-2-ylamino)-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one, which is effective in treating the autoimmune disease.

21. The method of claim 20, wherein the autoimmune disease is psoriasis, inflammation-like rheumatoid arthritis, lupus, type 1 diabetes, diabetic nephropathy, multiple
5 sclerosis, glomerulonephritis, organ transplant rejection, including host versus graft disease.

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002122

FIG. 1

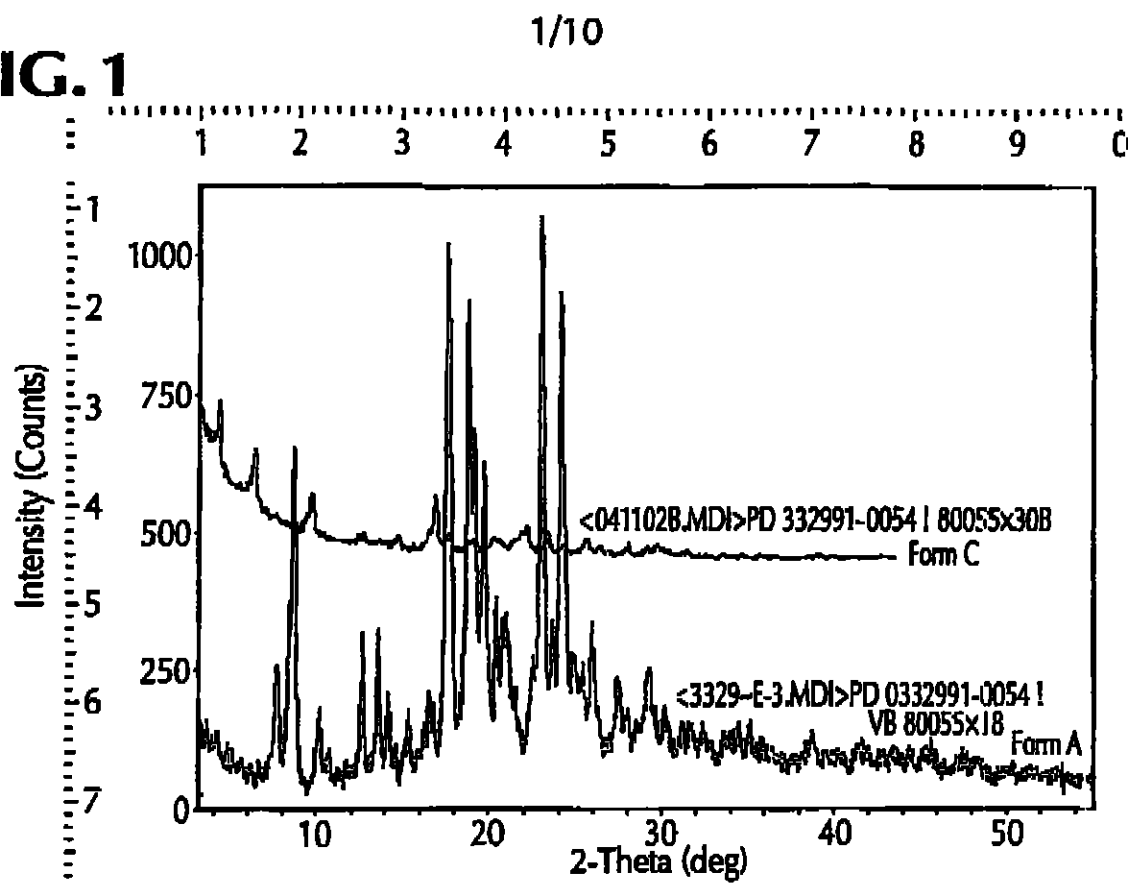
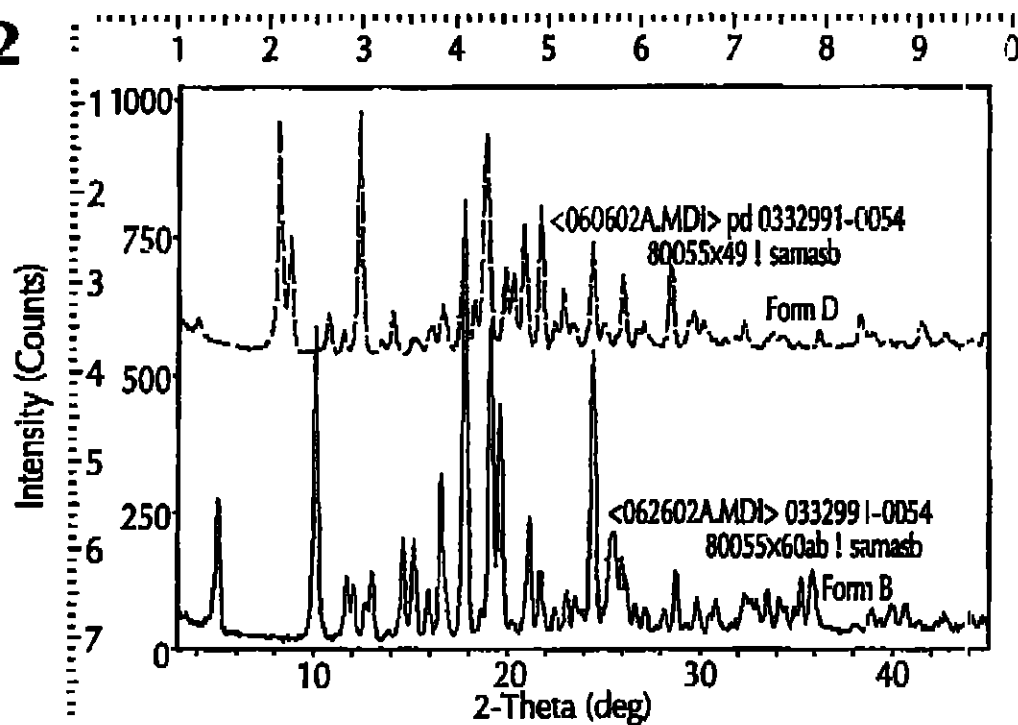


FIG. 2



WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

2/10

FIG. 3

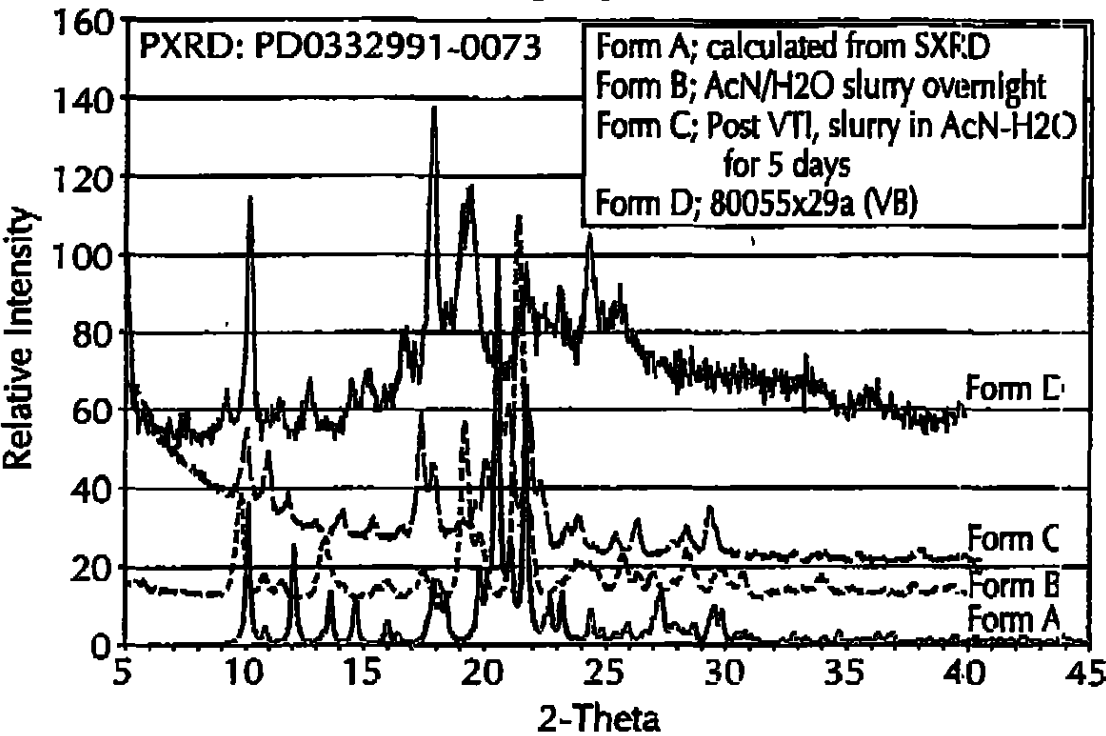
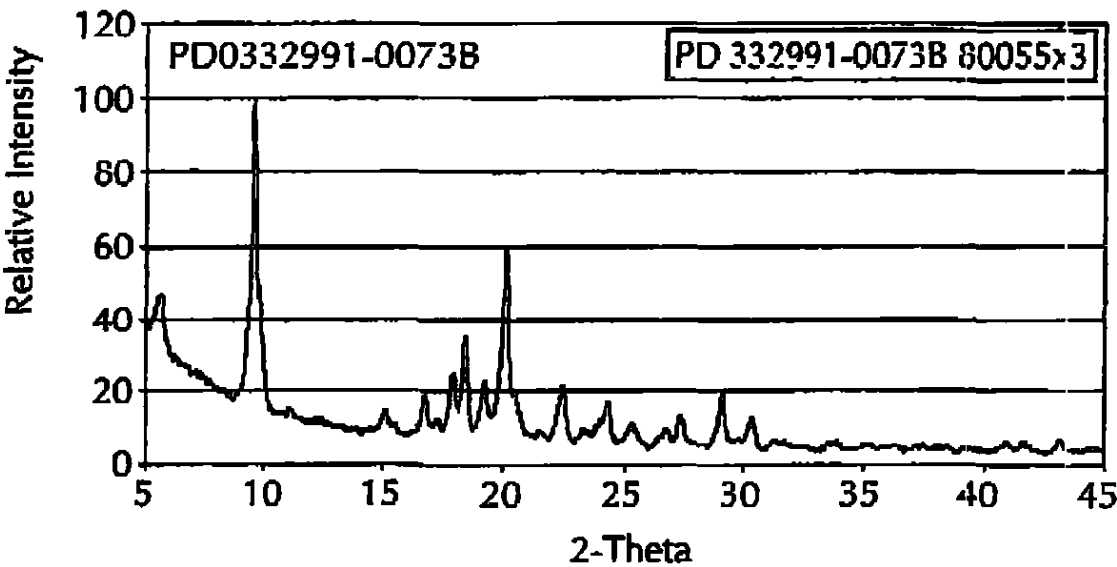


FIG. 4



WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

3/10

FIG. 5

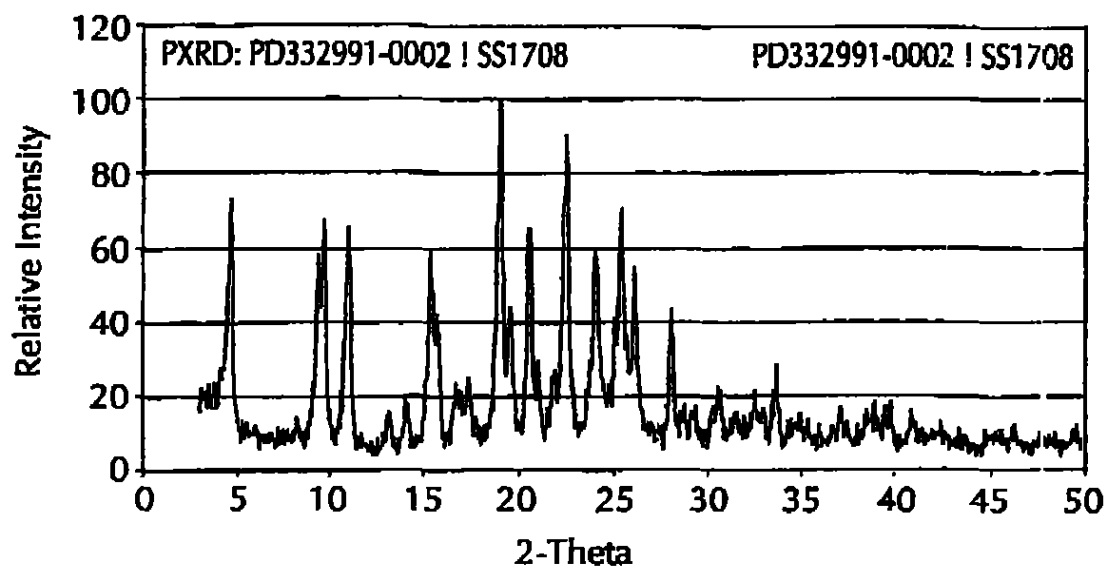
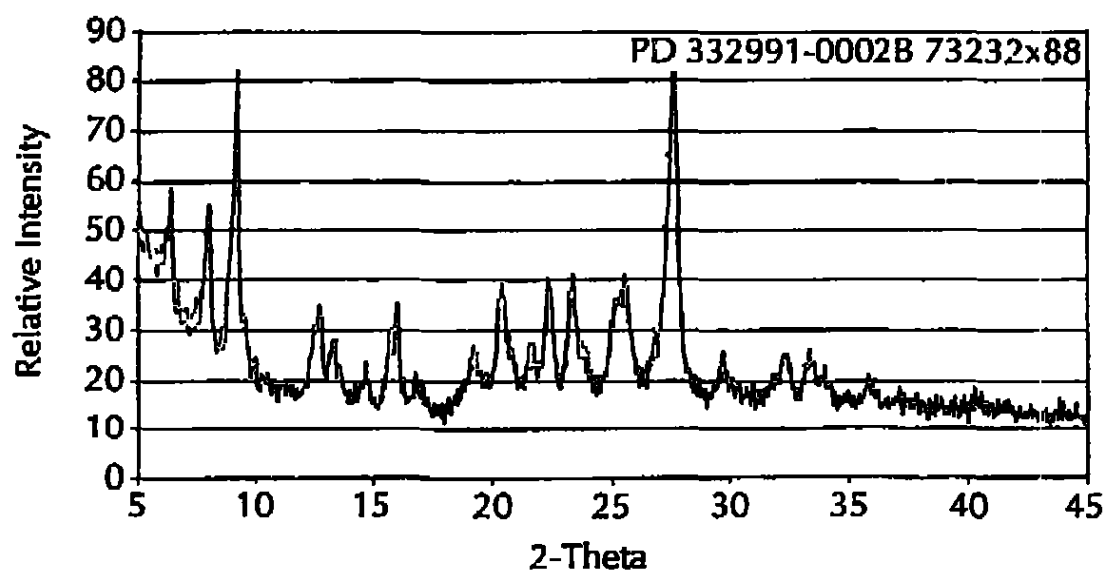


FIG. 6



4/10
FIG. 7

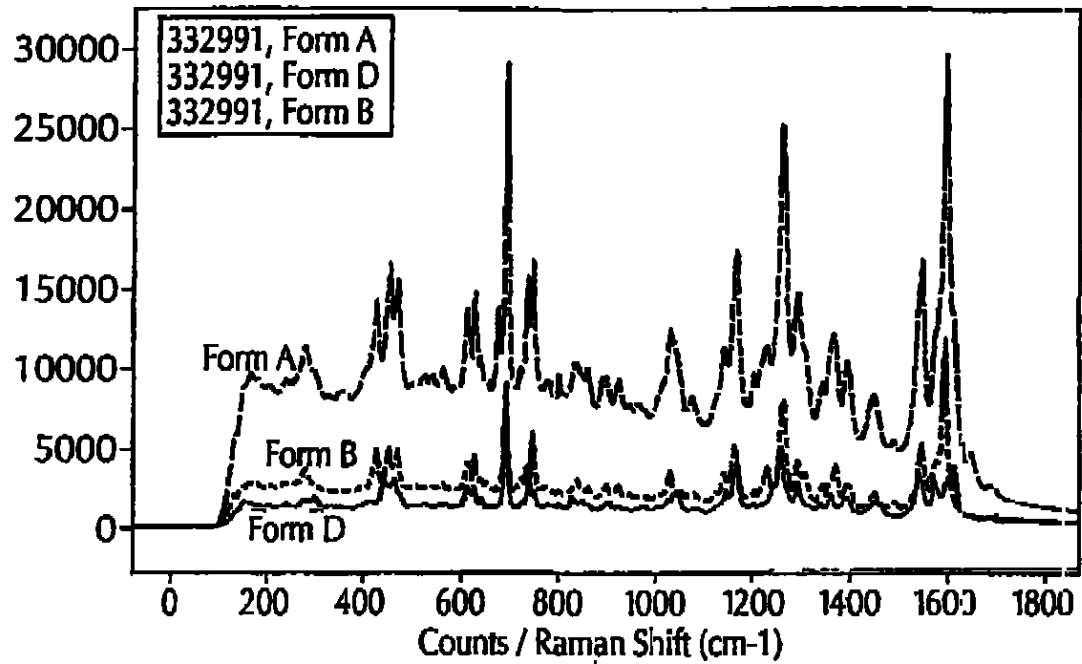
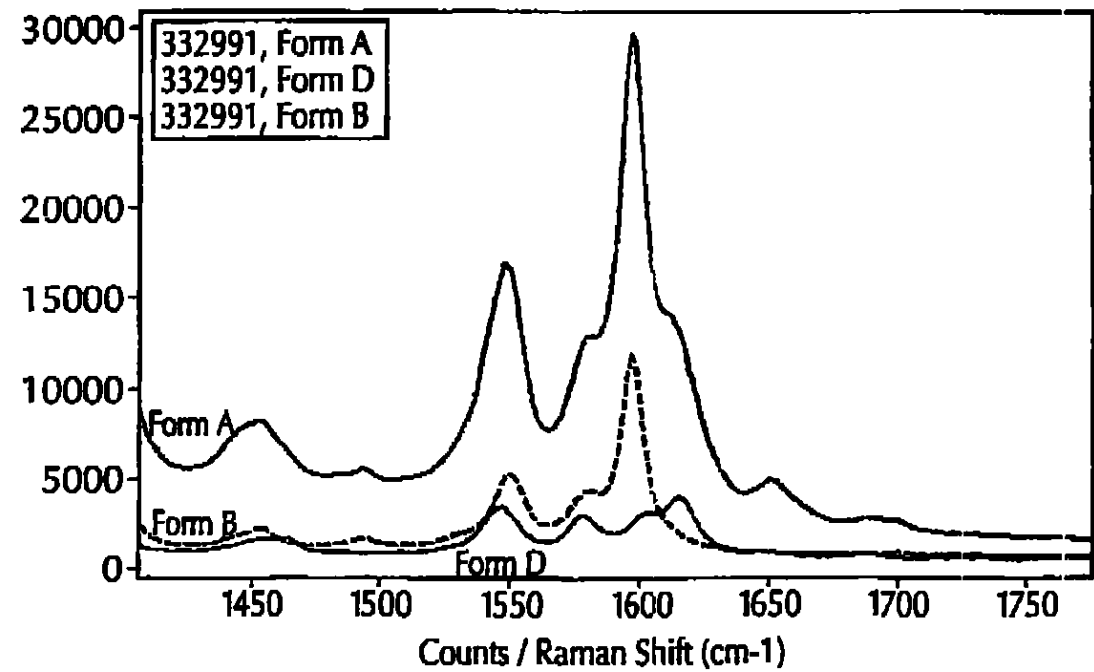


FIG. 8



WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

5/10

FIG. 9

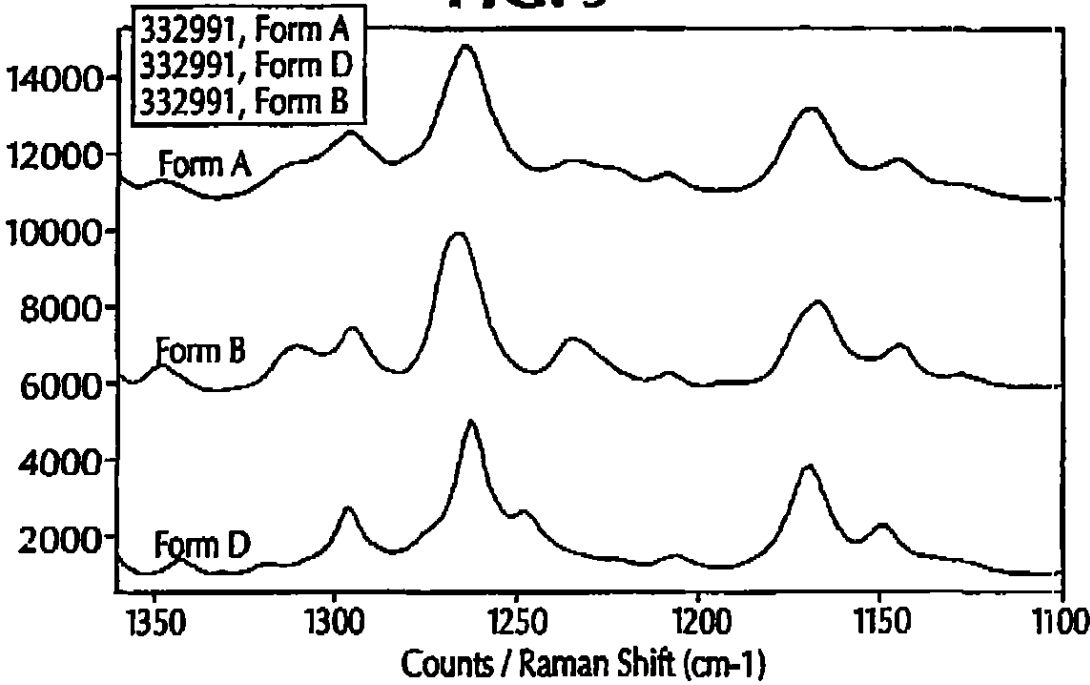
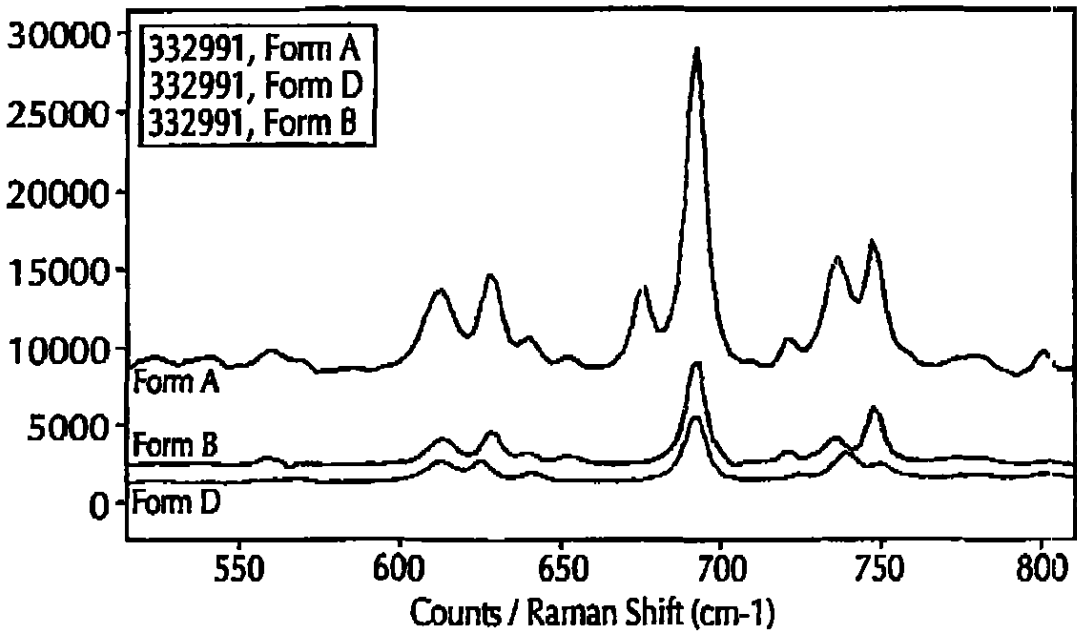


FIG. 10



43

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

FIG. 11

6/10

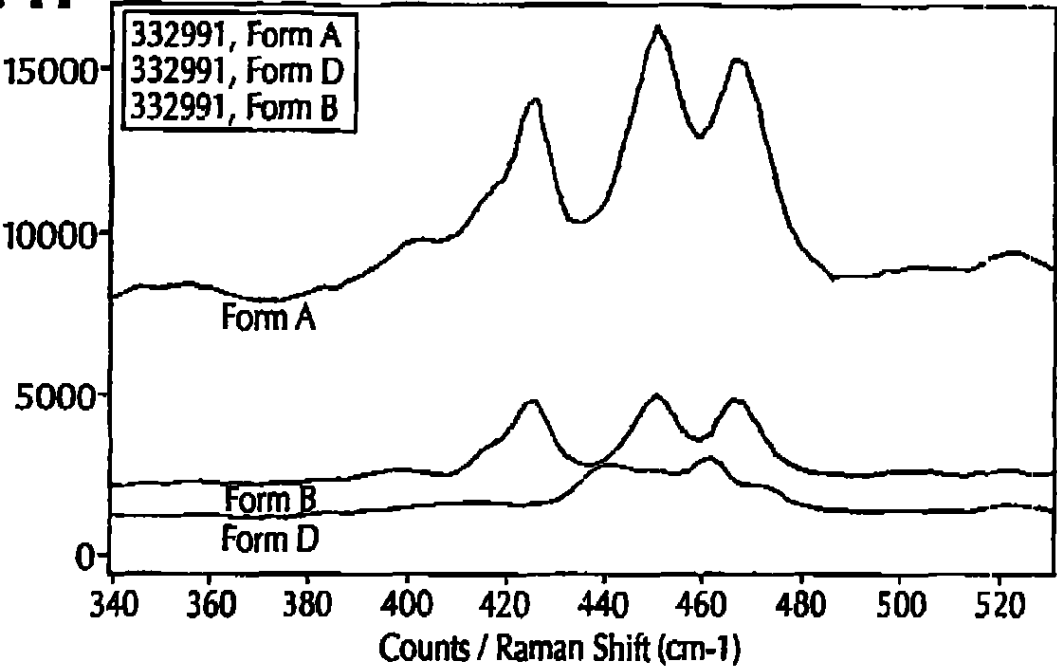
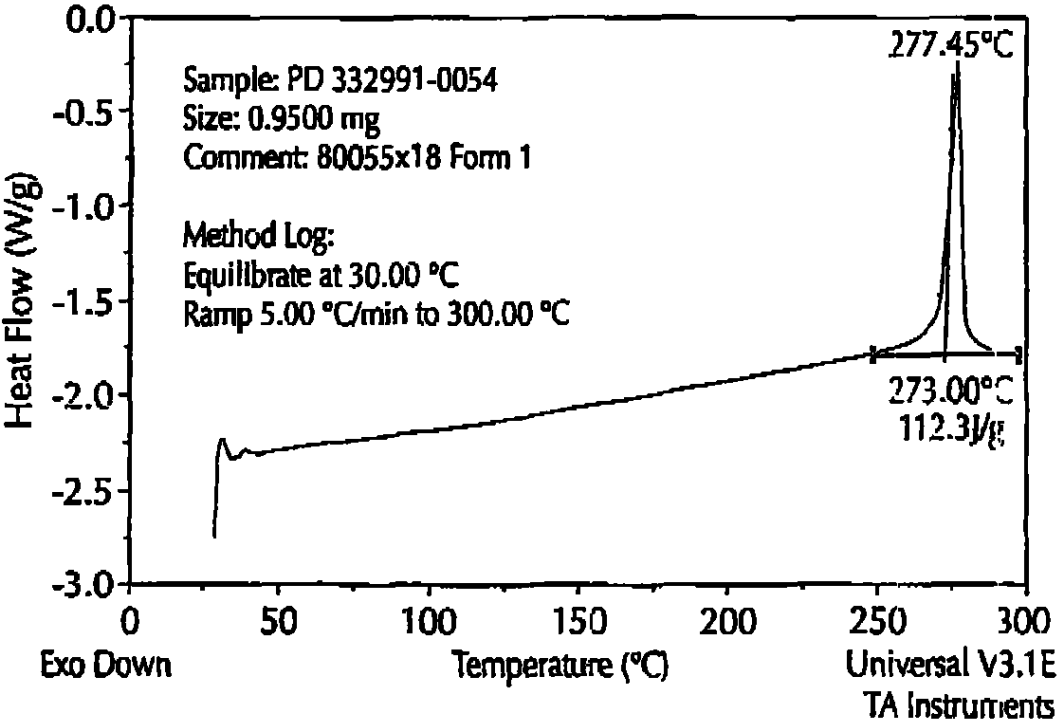


FIG. 12



44

WO 2005/005426

PCT/IB2004/002152

FIG. 13

7/10

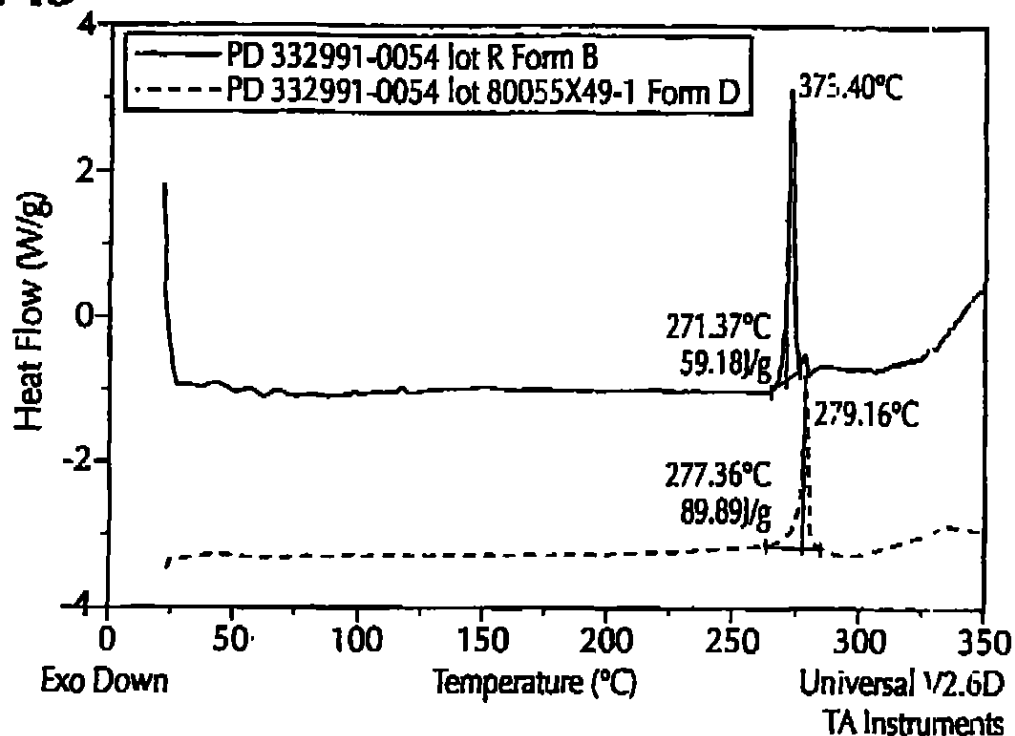


FIG. 14

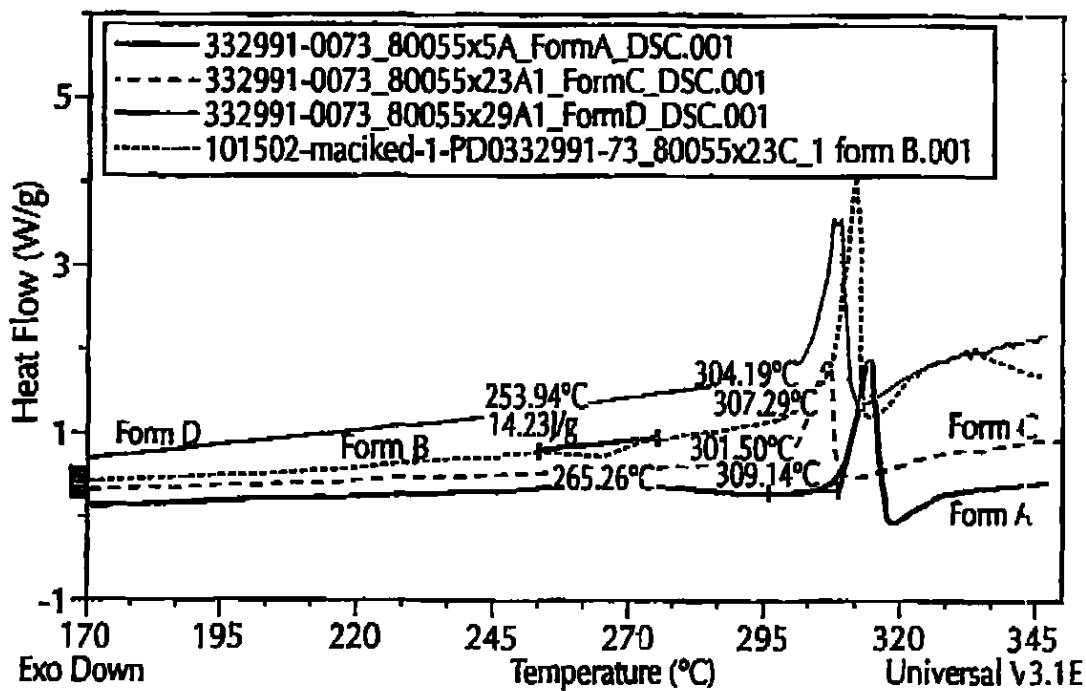


FIG. 15

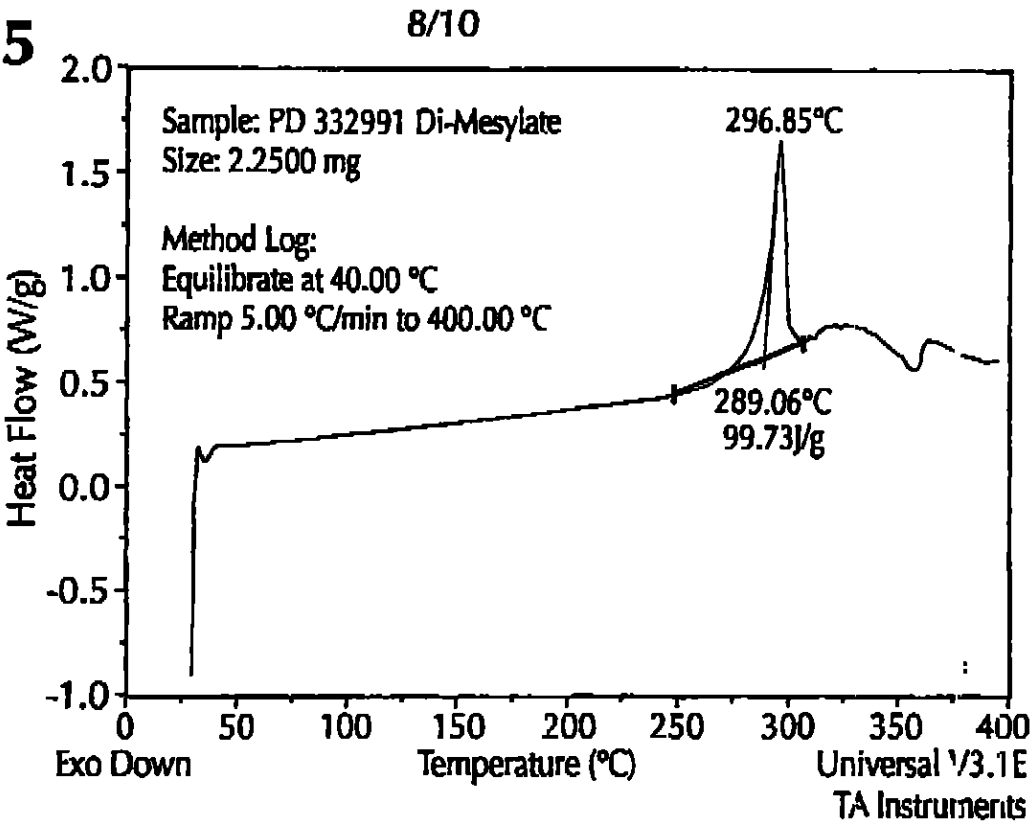
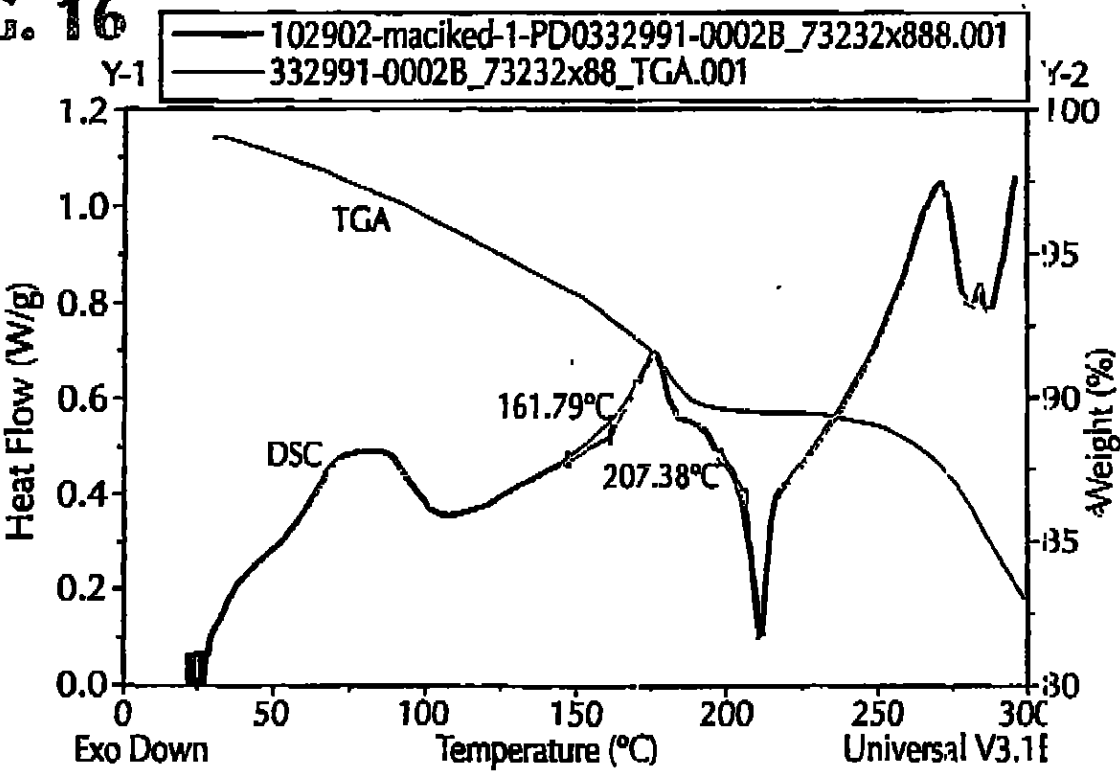
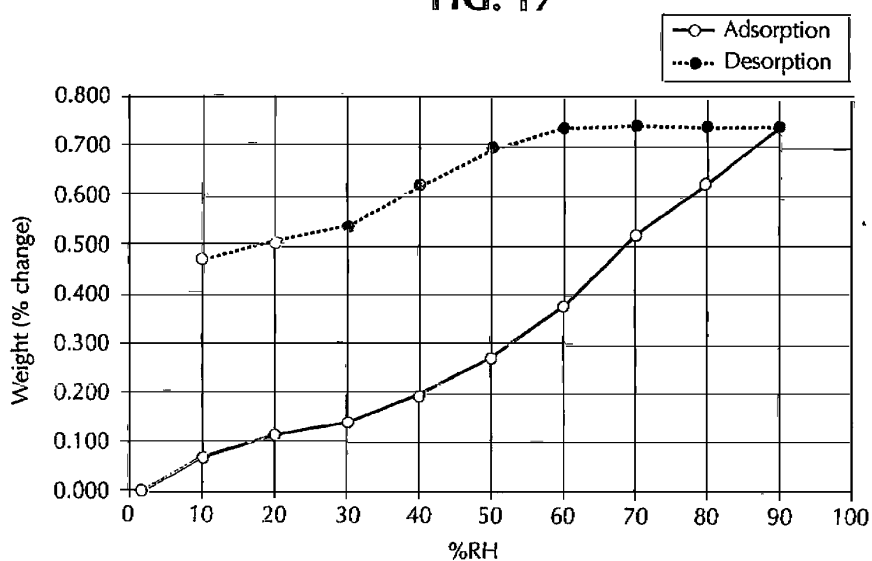


FIG. 16



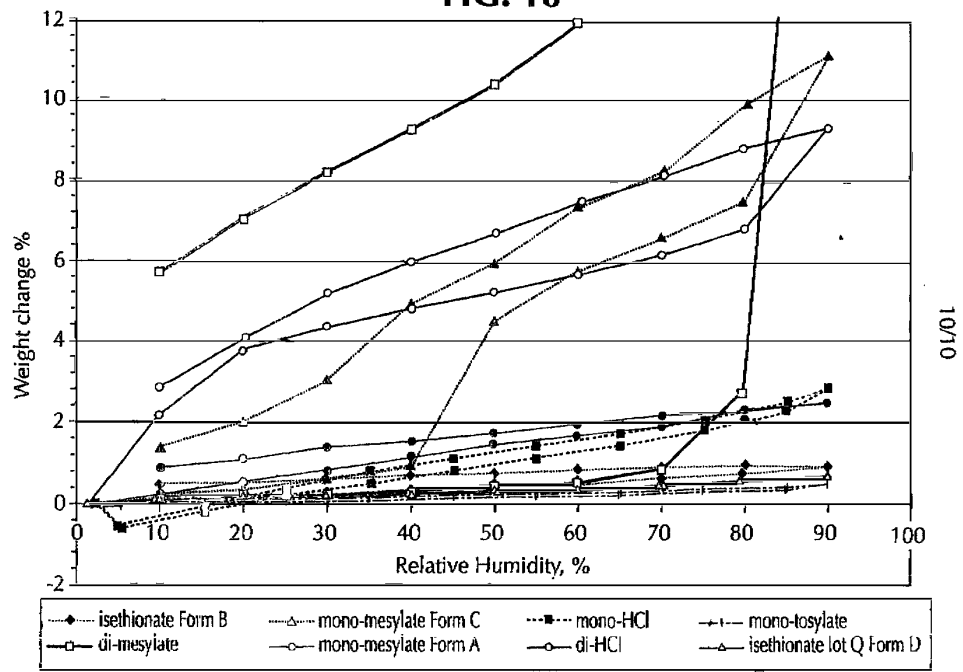
9/10

FIG. 17



47

FIG. 18



SAL DE ISETIONATO DE UN INHIBIDOR SELECTIVO DE CDK4

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a formas salinas de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que es un inhibidor selectivo de quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) que es útil para tratar las enfermedades inflamatorias y proliferativas de células tales como el cáncer y la reestenosis.

DISCUSION

15 Las quinasas dependientes de ciclina y las quinasas relacionadas con proteína serina/treonina son enzimas celulares importantes que realizan funciones esenciales en la regulación de la división y proliferación celular. Las unidades catalíticas de quinasa dependientes de ciclina se activan por subunidades reguladoras conocidas como ciclinas. Al menos han sido identificadas dieciséis ciclinas en mamíferos (D.G. Johnson y C.L. Walker, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1999) 39:295-312). Ciclina B/CDK-1, Ciclina A/CDK2, Ciclina E/CDK2; Ciclina D/CDK4, Ciclina D/CDK6 y probablemente otros heterodímeros, incluyendo CDK3 y CDK7, son los reguladores importantes de la progresión del ciclo celular. Las funciones adicionales de los heterodímeros Ciclina/CDK incluyen la regulación de la transcripción, la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis (D.O. Morgan, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (1997) 13261-13291).

Los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina pueden mostrarse útiles en el tratamiento del cáncer. Se ha mostrado que la actividad aumentada o la activación temporalmente anormal de quinasas dependientes de ciclina causa el desarrollo de tumores en seres humanos (C.J. Sherr, *Science* (1996) 274:1672-1677). De hecho, el desarrollo de tumores en seres humanos se asocia comúnmente con alteraciones en las mismas proteínas CDK o en sus reguladores (C. Cordon-Cardo, *Am. J. Pathol.* (1995) 147:545-560; J.E. Karp y S. Broder, *Nat. Med.* (1995) 1:309-320; M. Hall et al., *Adv. Cancer Res.* (1996) 68:67-108). Los inhibidores de proteína que ocurren naturalmente de las CDK, tales como p16 y p27, causan en líneas celulares de cáncer

de pulmón la inhibición *in vitro* del crecimiento (A. Kamb, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1998) 227-139-148).

Los inhibidores de molécula pequeña de CDK pueden usarse también en el tratamiento de trastornos cardiovasculares, tales como la reestenosis y la aterosclerosis y otros trastornos vasculares que son debidos a la proliferación celular aberrante. La proliferación de músculo vascular liso y la hiperplasia de la íntima después de la angioplastia coronaria son inhibidas por la sobreexpresión de la proteína p21 del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (M.W. Chang *et al.*, *J. Clin. Invest.* (1995) 96:2260; Z-Y. Yang *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* (1996) 93:9905). Además, el inhibidor CVT-313 CDK2 de purina (KI = 95 nM) causó mas del 80% de inhibición en la formación de aneurisma en ratas (E.E. Brooks *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1997) 29207-29211).

Los inhibidores de CDK pueden usarse para tratar enfermedades causadas por una variedad de agentes infecciosos, incluyendo hongos, parásitos de protozoos, tales como *Plasmodium falciparum* y virus de ARN y ADN. Por ejemplo, se requieren las quinasas dependientes de ciclina para la replicación viral después de la infección por el virus del herpes simple (HSV) (L.M. Schang *et al.*, *J Virol.* (1998) 72:5626) y se sabe que los homólogos de CDK juegan papeles esenciales en levaduras.

Pueden usarse inhibidores selectivos de CDK para mejorar los efectos de varios trastornos autoinmunes. La artritis reumatoide, una enfermedad crónica inflamatoria, se caracteriza por la hiperplasia del tejido sinovial. La inhibición de la proliferación de tejido sinovial debería reducir al mínimo la inflamación y prevenir la destrucción de la articulación. Se ha encontrado que la expresión de la proteína p16 del inhibidor de CDK en fibroblastos sinoviales inhibe el crecimiento (K. Taniguchi *et al.*, *Nat. Med.* (1999) 5:760-767). Asimismo, en un modelo de artritis en ratas, la hinchazón de la articulación fue inhibida sustancialmente por el tratamiento con un adenovirus que expresaba p16. Los inhibidores de CDK pueden ser eficaces contra otros trastornos de proliferación celular incluyendo la psoriasis (caracterizada por la hiperproliferación de queratinocito), glomerulonefritis y lupus.

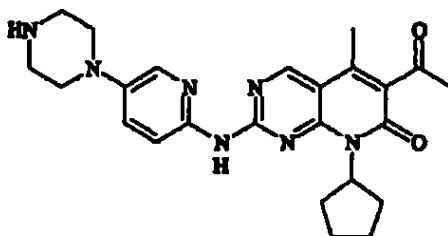
Ciertos inhibidores de CDK pueden ser útiles como agentes quimio-protectores por su capacidad de inhibir la progresión del ciclo celular en células normales no transformadas (Chen *et al.* *J. Natl. Cancer Institute* (2000) 92:1999-2008). El pretratamiento de un paciente con cáncer con un inhibidor de CDK antes del uso de agentes citotóxicos puede reducir los efectos secundarios comúnmente asociados con

la quimioterapia. Los tejidos proliferativos normales son protegidos de los efectos citotóxicos por la acción del inhibidor selectivo de CDK.

Los artículos de revisión sobre inhibidores de molécula pequeña de quinasas dependientes de ciclina han señalado la dificultad de identificar los compuestos que inhiben proteínas específicas de CDK sin inhibir otras enzimas. Así, a pesar de su potencial para tratar una variedad de enfermedades, ningún inhibidor de CDK ha sido aprobado actualmente para su uso comercial (P.M. Fischer, *Curr. Opin. Drug Discovery* (2001) 4:623-634; D.W. Fry y M.D. Garrett, *Curr. Opin. Oncologic. Endocrine & Metabolic. Invest.* (2000) 2:40-59; K R. Webster y D. Kimball, *Emerging Drugs* (2000) 5:45-59; T.M. Sielecki *et al.*, *J. Med. Chem.* (2000) 43:1-18.).

A pesar de estas dificultades, los estudios recientes han identificado un número de inhibidores selectivos de CDK4 que, como se ha dicho anteriormente, pueden demostrarse útiles en el tratamiento del cáncer - como agentes de anticáncer o como agentes quimio-protectores - y en el tratamiento de trastornos cardiovasculares, tales como reestenosis y aterosclerosis, enfermedades causadas por agentes infecciosos y trastornos autoinmunes, incluyendo la artritis reumatoide. Para una descripción de estos inhibidores selectivos de CDK4, véase la Solicitud de Patente Internacional PCT/IB03/00059 transferida legalmente, presentada el 10 de enero de 2003 (la solicitud '059), que se incorpora en este documento como referencia íntegramente para todos los objetivos.

La solicitud '059 describe un inhibidor particularmente potente y selectivo de CDK4 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido(2,3-d)pirimidin-7-ona:



25

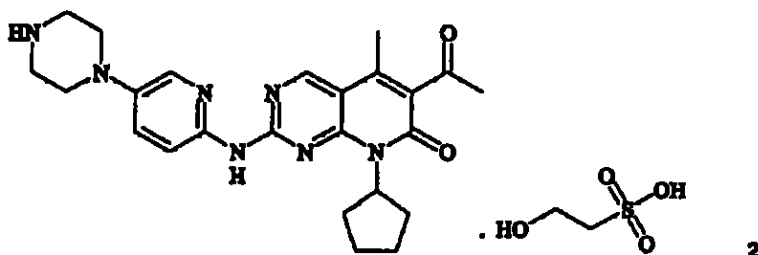
En ensayos enzimáticos estándar el compuesto de Fórmula 1 exhibe concentraciones de IC_{50} para la inhibición de CDK4 y CDK2 (a 25°C) de 0,011 μM y > 5 μM , respectivamente. Para una discusión de ensayos estándar de CDK4 y CDK2

para determinaciones de IC_{50} , véase D.W. Fry *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2001) 16617-16623.

Aunque el compuesto de Fórmula 1 sea un inhibidor potente y selectivo de CDK4, su uso en productos farmacéuticos presenta retos. Por ejemplo, la base libre
5 tiene una pobre solubilidad en agua (9 $\mu\text{g/mL}$) y exhibe una baja biodisponibilidad en estudios en animales. Una sal di-HCl del compuesto de Fórmula 1 parece exhibir la solubilidad adecuada en agua. Sin embargo, los estudios de respuesta frente a la humedad revelan que, hasta con una humedad relativa baja (10% de HR), la sal di-HCl absorbe agua en una cantidad mayor de aproximadamente el 2% de su masa,
10 haciéndola inadecuada para uso como un producto farmacéutico sólido. Una sal mono-HCl del compuesto de Fórmula 1 es ligeramente higroscópica, absorbiendo más del 2% de su masa a una humedad relativa por encima del 80%. Sin embargo, el procedimiento para preparar la sal mono-HCl proporciona parcialmente una sustancia de fármaco cristalina, indicando problemas potenciales con procesos a gran escala.
15 Otras formas salinas del compuesto de Fórmula 1 son, por lo tanto, necesarias.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]primidin-7-ona,
20 que se representa por la Fórmula 2:



La sal de isetionato puede existir como uno o varios polimorfos, incluyendo la
25 Forma A, la Forma B y la Forma D. Cada uno de los polimorfos puede distinguirse por su perfil (difractograma) de difracción de rayos X en polvo (PXRD), o por el espectro Raman, o por el termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC), o alguna combinación del perfil de PXRD, espectro Raman y termograma DSC. La sal de

isetionato puede ser anhidra, o puede contener cantidades variables de agua o uno o varios disolventes.

Así, un aspecto de la presente invención proporciona una sal de mono-isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que se designa como la Forma A y se caracteriza por uno o varios de lo siguiente: un perfil de difracción de rayos X en polvo que tiene picos a valores de 2θ de aproximadamente 8,7, 13,5 y 17,6, o un espectro Raman que tiene picos en los valores de desplazamiento Raman de aproximadamente 1600 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 675 cm^{-1} , 470 cm^{-1} , 450 cm^{-1} y 425 cm^{-1} , o un termograma DSC que tiene una endotermia estrecha a 273°C .

Otro aspecto de la presente invención proporciona una sal de mono-isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que se designa como la Forma B y se caracteriza por uno o varios de lo siguiente: un perfil de difracción de Rayos X en polvo que tiene picos a valores de 2θ de aproximadamente 5,1, 11,8, 12,1, 12,8, 13,1 y 14,7, un espectro Raman que tiene picos en los valores de desplazamiento Raman de aproximadamente 1600 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 470 cm^{-1} , 450 cm^{-1} y 425 cm^{-1} , pero ningún pico sustancial a 675 cm^{-1} , o un termograma DSC que tiene una endotermia estrecha a 271°C .

Un aspecto más de la presente invención proporciona una sal de mono-isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que se designa como la Forma D y que se caracteriza por uno o varios de lo siguiente. un perfil de difracción de rayos X en polvo que tiene picos a valores de 2θ de aproximadamente 8,4, 8,9 y 21,9, un espectro Raman que tiene un pico en un valor de desplazamiento Raman de aproximadamente 463 cm^{-1} , o un termograma DSC que tiene una endotermia estrecha a 277°C . Para cada forma de sal, el perfil de difracción de rayos X en polvo se obtiene usando radiación CuK_{α} y se obtiene el termograma DSC usando una velocidad de calentamiento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La presente invención también proporciona formas de dosificación farmacéuticas que incluyen una sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes útiles incluyen agentes disgregantes, aglomerantes, diluyentes, tensioactivos, lubricantes, conservantes, antioxidantes, aromatizantes, colorantes y otros similares.

La presente invención también proporciona métodos para preparar la sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-

pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona. Un método incluye añadir una solución de ácido isetiónico y un primer disolvente a una mezcla acuosa de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona, para producir una primera mezcla. El método también incluye liofilizar la mezcla para dar una sal amorfa que posteriormente se combina con un segundo disolvente para producir una segunda mezcla que incluye la sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona.

Otro método incluye suministrar un cristal semilla de una forma de sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona y añadir el cristal semilla a una dispersión de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona y un primer disolvente para producir una primera mezcla. El método también incluye combinar la primera mezcla con una solución de ácido isetiónico y un segundo disolvente para producir una segunda mezcla que incluye la sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona.

En ambos de los métodos anteriores, los primeros y segundos disolventes pueden ser los mismos o diferentes y son disolventes miscibles en agua, incluyendo MeOH, EtOH y otros alcoholes. Para mejorar los rendimientos, los métodos pueden incluir calentar, refrigerar, o calentar y refrigerar la segunda mezcla a temperaturas superiores e inferiores a la temperatura ambiente. Por ejemplo, la segunda mezcla puede ser calentada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C y posteriormente permitirse enfriar a temperatura ambiente. De forma alternativa, puede permitirse a la segunda mezcla estar a temperatura ambiente y posteriormente enfriarse a una temperatura igual o inferior a aproximadamente 0°C. Asimismo, la segunda mezcla puede ser calentada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C y posteriormente enfriarse a una temperatura igual o inferior a aproximadamente 0°C.

Otro método incluye hacer reaccionar el éster *terc*-butilico del ácido 4-{6-[6-(1-butoxi-vinil)-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidro-pirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il}-piperazin-1-carboxílico con ácido isetiónico en un disolvente y agua para dar una mezcla que incluye una sal de di-isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona. El método opcionalmente incluye añadir una base impedida a la mezcla de reacción para generar

una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona.

La presente invención proporciona además un método para tratar un trastorno o condición en un mamífero, incluyendo a un ser humano, causado por la proliferación de células anormales, o por infecciones virales o micóticas, o por una enfermedad autoinmune. El método incluye administrar al mamífero una cantidad de una sal de isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que es eficaz en el tratamiento del trastorno o de la condición. Los trastornos o las condiciones causados por la proliferación de células anormales incluyen cáncer y proliferación de músculo liso vascular asociada con aterosclerosis, estenosis porst-quirúrgica vascular y reestenosis y endometriosis. Las enfermedades autoinmunes incluyen la psoriasis, la artritis reumatoide de tipo inflamatoria, lupus, la diabetes de tipo I, nefropatía diabética, esclerosis múltiple, glomerulonefritis y el rechazo de trasplantes de órgano, incluyendo la enfermedad Injerto-contrahuésped.

La sal de isetionato proporciona ventajas significativas frente a la base libre (Fórmula 1) y otras formas salinas, incluyendo las sales de adición de mono- y di-HCl. Comparado con la base libre, la sal de isetionato exhibe una mejora de más de 20.000 veces la solubilidad en agua. A diferencia del caso de la sal de di-HCl, sin embargo, la mejora de la solubilidad no se acompaña con un aumento sustancial de la higroscopicidad. Además, la sal de isetionato es sustancialmente cristalina y, por lo tanto, no sufre de problemas a gran escala potenciales asociados con la sal de mono-HCl. Estas y otras ventajas deberían ayudar a aliviar muchos de los desafíos que afrontan el desarrollo de productos farmacéuticos que contienen el inhibidor selectivo de CDK4 de Fórmula 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Varias características, ventajas y otros usos de la presente invención se harán más evidentes refiriéndose a la descripción y dibujos siguientes en los que:

La figura 1 muestra un perfil de PXR de una sal de mono-isetionato (Forma A) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 2 muestra el perfil de PXRD de una sal de mono-isetonato (Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 3 muestra un perfil de PXRD de una sal de mono-mesilato (Forma A, Forma B, Forma C y Forma D), de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona,

La figura 4 muestra un perfil de PXRD de una sal de di-mesilato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 5 muestra un perfil de PXRD de una sal mono-HCl de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 6 muestra un perfil de PXRD de una sal di-HCl de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 7 muestra los espectros Raman de una sal de mono-isetonato (Forma A, Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que tiene desplazamientos Raman en el intervalo de 0 cm^{-1} a 1850 cm^{-1} ;

La Figura 8 muestra los espectros Raman de una sal de mono-isetonato (Forma A, Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que tiene desplazamientos Raman en el intervalo de 1350 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} ;

La figura 9 muestra los espectros Raman de una sal de mono-isetonato (Forma A, Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que tiene desplazamientos Raman en el intervalo de 1100 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} ;

La figura 10 muestra los espectros Raman de una sal de mono-isetonato (Forma A, Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que tiene desplazamientos Raman en el intervalo de 500 cm^{-1} a 850 cm^{-1} ;

La figura 11 muestra los espectros de Raman de una sal de mono-isetonato (Forma A, Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que tiene desplazamientos Raman en el intervalo de 340 cm^{-1} a 550 cm^{-1} ;

La figura 12 muestra un termograma DSC de una sal de mono-isetonato (Forma A) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 13 muestra termogramas DSC de una sal de mono-isetonato (Forma B y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 14 muestra termogramas DSC de una sal de mono-mesilato (Forma A, Forma B, Forma C y Forma D) de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 15 muestra un termograma DSC de una sal de di-mesilato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 16 muestra un termograma DSC de una sal di-HCl de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 17 muestra isotermas de adsorción/desorción en agua para la base libre de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

La figura 18 muestra isotermas de adsorción/desorción en agua para varias sales de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, incluyendo mono-isetonato, (Forma B y Forma D), mono- y di-HCl, mono-mesilato (Forma A y Forma C), di-mesilato y mono-tosilato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

A no ser que se indique de otra manera, esta descripción usa las definiciones proporcionadas a continuación.

El término "cáncer" incluye, pero no se limita, a los cánceres siguientes: cánceres de ovario, pecho, cerviz, próstata, testículo, esófago, estómago, piel, pulmón, hueso, colon, páncreas, tiroides, canales biliares, cavidad bucal y faringe (oral), labios, lengua, boca, faringe, Intestino delgado, colon-recto, intestino grueso, recto, cerebro y sistema nervioso central, glioblastoma, neuroblastoma, queratoacantoma, carcinoma epidermoide, carcinoma de célula grande, adenocarcinoma, adenocarcinoma, adenoma, adenocarcinoma, carcinoma folicular, carcinoma no diferenciado, carcinoma papilar, seminoma, melanoma, sarcoma, carcinoma de vejiga, carcinoma de hígado, carcinoma de riñón, trastornos mieloides, trastornos linfoides, enfermedad de Hodgkin, células capilares y leucemia.

5758

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias, que son en la amplitud del sano juicio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica y similares, conmensurativa con una relación razonable de beneficio/riesgo y eficaz para su uso intencionado.

El término "tratar" se refiere a invertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir un trastorno o una condición a la que se aplica tal término o para prevenir uno o varios síntomas de tal trastorno o condición.

El término "tratamiento" se refiere al acto de "tratar" como se define inmediatamente arriba.

La tabla 1 enumera las abreviaturas usadas en la memoria descriptiva.

Tabla 1. Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
Aq	acuoso
ACN	acetonitrilo
BOC	terc-butoxicarbonilo
DCM	diclorometano
DSC	calorimetría diferencial de barrido
Et ₃ N	triethylamina
EtOH	alcohol etílico
h, minuto, s	hora, minuto, segundo
IPA	alcohol isopropílico
MeOH	metanol
PXRD	difracción de rayos X en polvo
HR	humedad relativa
TA	temperatura ambiente, p. ej. 20°C-25°C
THF	tetrahidrofurano
mgA/mL	miligramos de sustancia activa por mililitro de solución

La sal de mono-Isetionato (Fórmula 2) puede existir como uno o varios polimorfos, incluyendo la Forma A, Forma B y Forma D. Como se indica anteriormente, cada uno de los polimorfos puede distinguirse por la difracción de rayos X en polvo (PXRD), o por espectroscopia Raman, o por calorimetría diferencial de barrido (DSC),

58

o alguna combinación de estos métodos de caracterización. La sal de mono-isetionato (Fórmula 2) puede ser anhidra, o puede contener cantidades variables de agua o uno o varios disolventes. Además, la sal de mono-isetionato (Fórmula 2) puede ser sustancialmente pura, es decir, puede contener al menos aproximadamente 99% en peso de un polimorfo particular o puede ser una mezcla de dos o más de los polimorfos (por ejemplo, Forma B y Forma D, etc.).

La base libre (Fórmula 1) es un compuesto dibásico, que puede formarse tanto como sales de adición de mono- como de di-ácido. Su ácido conjugado tiene un pK_a s de 7,3 y 4,1, de modo que son necesarios ácidos relativamente fuertes para generar la di-sal. Aunque pueda ser posible formar una sal de di-isetionato del compuesto de Fórmula 1, la sal de mono-isetionato parece ser más útil porque requiere menos contra-ión.

La figura 1 y la figura 2 proporcionan difractogramas de PXRD para las formas salinas de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Fórmula 2). Estas formas son designadas como la Forma A en la figura 1 y la Forma B y Forma D en la figura 2. Para mejorar la legibilidad, el difractograma de la Forma D en la figura 2 ha sido desplazado hacia arriba aproximadamente unas 700 unidades. La tabla 2, debajo, enumera los picos de PXRD significativos (es decir, aquellos que exhiben la relación altura de pico frente al ruido mayor que 3,5) para los polimorfos de mono-isetionato A, B y D y proporciona con la fuente del formato subrayado un subconjunto de picos característicos que pueden usarse para distinguir un polimorfo del otro. La lista de picos característicos proporcionados en la tabla 2 no es la única lista posible de picos característicos. Las personas expertas ordinarias en la técnica de identificación de polimorfos pueden escoger otros conjuntos de picos característicos que también distinguirán a un polimorfo del otro.

Con objetivos de comparación, las figura 3-figura 6 muestran difractogramas de PXRD para, respectivamente, las sales de mono-mesilato, di-mesilato, mono-HCl y di-HCl de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. Aunque estas sales puedan existir en más de una forma, los polimorfos distintos sólo han sido identificado para la sal de mono-mesilato, cuya figura 3 designa como la Forma A, Forma B, Forma C y la Forma D. Para destacar las diferencias entre las formas salinas de mono-mesilato, los difractogramas de la Forma B, la Forma C y la Forma D en la figura 3 han sido desplazados hacia arriba en varias cantidades.

Cada uno de los perfiles de PXRD mostrados en las figura 1-figura 6 fueron obtenidos en un difractómetro de rayos X D/Max 2200 de RIGAKU para polvo usando radiación CuK_α . El difractómetro fue equipado con un tubo de rayos X de foco fino. Durante cada experimento, el voltaje del tubo y la corriente fueron puestos a 40 kV y 40 mA, respectivamente, las rendijas de divergencia y dispersión fueron puestas a $0,5^\circ$ y la rendija receptora fue puesta a 0,3 mm. La radiación difractada fue detectada usando un detector de centelleo de NaI. Para cada uno de los experimentos, fue usada una exploración continua de θ - 2θ de aproximadamente $1^\circ/\text{minuto}$ ($3 \text{ s}/0,040^\circ$ etapa) de $3,0$ a $40,0^\circ 2\theta$. Las muestras fueron preparadas para el análisis colocándolas en un soporte de oblea de silicio. Los datos fueron recogidos usando el software RIGMEAS de RIGAKU y fueron analizados usando un paquete de software desarrollado por el propietario usando la plataforma de software JADE.

Para cada medida de difracción de rayos X en polvo, fue colocada una muestra de una forma de sal en una cavidad localizada sobre una superficie plana del soporte y fue usado un portaobjetos para nivelar la superficie de la muestra. El soporte, que contenía la muestra, se colocó en el difractómetro y la fuente de haz de rayos X irradió la muestra, al principio con un pequeño ángulo en relación con la superficie plana del soporte. El haz de rayos X fue movido posteriormente formando un arco a razón de varias etapas, que sucesivamente aumentaron el ángulo entre el haz incidente y la superficie plana del soporte. En cada etapa de la exploración, el contador de centelleo detectó la cantidad de radiación difractada, que fue registrada como una función de 2θ . El software del instrumento muestra los resultados de radiación difractada de la exploración como Intensidad frente a 2θ (figura 1-figura 6).

Pueden surgir diferencias del perfil PXRD entre las medidas separadas del mismo polimorfo por muchos motivos. Las fuentes de error incluyen variaciones en la preparación de la muestra (por ejemplo, la altura de la muestra), errores de instrumento, errores de calibración y errores de operador (incluyendo errores en la determinación de las posiciones de los picos). La orientación preferencial, es decir, una carencia de la orientación arbitraria de los cristales en la muestra de PXRD, puede causar diferencias significativas de alturas de pico relativas. Los errores de calibración y los errores de altura de la muestra a menudo causan un desplazamiento de todos los picos del difractograma en la misma dirección y por la misma cantidad. Pequeñas diferencias de la altura de la muestra sobre un soporte plano pueden conducir a grandes desplazamientos en las posiciones de los picos de PXRD. Para un estudio sistemático mostrando que las diferencias de altura de la muestra de 1 mm pueden

conducir a desplazamientos de picos tan altos como 1 °2θ véase Chen *et al.*, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2001) 26:63.

En muchos casos, los desplazamientos de picos entre perfiles de difracción que son resultado del error sistemático pueden eliminarse compensando el desplazamiento (por ejemplo, aplicando un factor de corrección a todos los valores de posición de picos) o calibrando de nuevo el difractómetro. Generalmente, pueden usarse las mismas técnicas para compensar las diferencias entre difractómetros de modo que las posiciones de pico de PXRD obtenidas de dos instrumentos diferentes puedan llevarse a una concordancia. Además, cuando estas técnicas son aplicadas a medidas PXRD del mismo o diferente difractómetro las posiciones de los picos para un polimorfo particular por lo general tendrán concordancia en aproximadamente $\pm 0,2$ °2 θ.

Tabla 2. Picos de PXRD significativos para la Forma A, B y D de la sal de mono-isetionato

Polimorfo	Picos significativos, 2θ (los valores subrayados son característicos de un polimorfo particular)
A	<u>8,7</u> , 12,6, <u>13,5</u> , <u>17,6</u> , 18,8, 19,6, 19,8, 23,0, 24,2
B	<u>5,1</u> , 10,2, <u>11,8</u> , <u>12,1</u> , <u>12,8</u> , <u>13,1</u> , <u>14,7</u> , 15,2, 16,0, 16,6, 17,9, 19,2, 19,7, 21,3, 21,9, 22,6, 23,2, 24,6, 25,6, 26,1, 28,9, 30,0, 30,9, 32,5, 33,0, 32,5, 33,0, 34,2, 35,3, 36,0
D	<u>8,4</u> , <u>8,9</u> , 10,8, 12,6, 14,2, 16,8, 17,9, 18,4, 19,1, 20,0, 20,4, 21,0, <u>21,9</u> , 22,6, 23,0, 23,6, 24,6, 26,2, 27,2, 28,7, 29,8, 30,3, 38,4

Las figura 7-figura 11 muestran los espectros Raman de las formas salinas de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-il-amino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Fórmula 2). La figura 7 muestra los espectros Raman de la sal de mono-isetionato de las Forma A, Forma B, Forma D para desplazamientos Raman en el intervalo de 0 cm⁻¹ a 1850 cm⁻¹, mientras que las figura 8-figura 11 proporcionan los espectros Raman para la sal de mono-isetionato de las Forma A, Forma B y Forma D para desplazamientos Raman en el intervalo de 1350 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹, de 1100 cm⁻¹ a 1350 cm⁻¹, de 500 cm⁻¹ a 850 cm⁻¹ y de 340 cm⁻¹ a 550 cm⁻¹, respectivamente. En algunas de las figuras, uno o varios de los espectros Raman pueden emplear diferentes ordenes de escala (por ejemplo, la Forma A en las figuras

7, 8, 10 y 11) o líneas de fondo diferentes (por ejemplo, las Forma A y Forma B en la figura 9) o ordenes de escala y líneas de fondo diferentes (figura 10) para acentuar las diferencias entre las formas salinas de mono-isetonato.

5 La tabla 3, debajo, enumera los picos característicos de los espectros Raman que pueden usarse para distinguir una forma de sal de mono-isetonato de la otra. Como con los datos de PXRD, la lista de picos característicos proporcionados en la tabla 3 no es la única lista posible de picos característicos y personas expertas ordinarias en la técnica de identificación de polimorfos pueden escoger otro grupo de picos característicos que también distinguirán un polimorfo del otro.

10 Los espectros Raman mostrados en las figura 7-figura 11 fueron obtenidos usando un microscopio y espectrógrafo Raman de KAISER OPTICAL SYSTEMS HOLOLAB. El espectrógrafo Raman utiliza un láser de diodo en estado sólido que opera a 785 nm con una potencia de salida de aproximadamente 90 mW. La potencia de entrada a la muestra por el objetivo del microscopio era de aproximadamente 27
15 mW. Fue usado un detector CCD termoelectrónico enfriado para detectar la señal Raman. Los cables de fibra óptica que conectan el microscopio y el espectrógrafo Raman fueron usados para dirigir la luz de excitación láser y la luz dispersada Raman desde y hacia la muestra, respectivamente.

20 Para obtener los espectros representativos Raman, las muestras de cada una de las formas polimorfas fueron sondadas en múltiples posiciones o puntos. Para cada muestra, los espectros Raman fueron obtenidos a cuatro o cinco puntos, con cuatro espectros replicados en cada punto. Como es normalmente el caso con muestras sólidas, los datos para una forma polimorfa dada exhibieron la mayor variación de intensidad de pico y exhibieron relativamente poca variación en la posición del pico.
25 Para cada una de las formas, los valores del desplazamiento Raman (posiciones de pico como una función del número de onda) variaban en menos de 1 cm^{-1} , aunque como se esperara, las posiciones de picos entre las formas diferentes podrían variar en más de 1 cm^{-1} . Al menos algo de la variación en la intensidad de pico o en la posición de pico, como se piensa, proviene de las diferencias del modo en que la luz
30 de láser golpea los diferentes cristales en la muestra.

Tabla 3. Picos característicos de espectros Raman para las Formas A, B y D de la sal de mono-isetionato

5	Pico (cm ⁻¹)	El pico es característico de este polimorfo
	1600	A y B
	1290	A y B
	675	A
	470	A y B
10	463	D
	450	A y B
	425	A y B

Como la variación de experimento-a-experimento descrita anteriormente, los espectros Raman de un polimorfo particular que se obtienen usando instrumentos diferentes parecen exhibir poca variación (p. ej., 1 cm⁻¹ o menos) en la posición del pico y relativamente mayor variación en la intensidad del pico. Considerando que la dispersión Raman es independiente de la longitud de onda de excitación usada, las posiciones de los picos deberían estar sobre la misma posición entre los instrumentos que usan fuentes de excitación diferentes. Las intensidades de picos pueden variar dependiendo, entre otras cosas, del tipo de detector u óptica, de la potencia del láser de excitación y de la posición de la muestra.

Las figura 12 y figura 13 muestran termogramas DSC de las formas salinas de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-il-amino-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Fórmula 2) designadas como la Forma A (figura 12) y las Formas B y D (figura 13). Además, las figura 14-figura 16 muestran termogramas DSC de la sal de mono-mesilato (Formas A, B, C y D), la sal de di-mesilato y la sal di-HCl, respectivamente. Los datos de DSC fueron obtenidos usando un DSC V2.6 Modulado de TA INSTRUMENTS 2920. Las muestras de polimorfos individuales fueron analizadas al aire, selladas en platillos de aluminio usando una velocidad de calentamiento de 5°C/min a 350°C y una purga de nitrógeno de 50 mL/min.

Como se muestra en las figura 12-figura 15, la sal de mono-isetionato (Formas A, B y D), la sal de mono-mesilato (Formas A, B, C y D) y la sal de di-mesilato tienen puntos de fusión distintos, exhibiendo endotermias estrechas a aproximadamente 273°C, 271°C, 277°C, 309°C, 307°C, 302°C, 304°C y 289°C, respectivamente. Al

contrario, la sal di-HCl (figura 16) posee un termograma DSC relativamente complejo, que incluye amplias endotermias entre aproximadamente 40°C y 110°C y entre aproximadamente 160°C y 200°C, que probablemente indican la pérdida de humedad y agua reticular, respectivamente. La traza de DSC de la sal di-HCl también exhibe un
5 comienzo de exotermia relativamente estrecho a aproximadamente 207°C y una amplia endotermia que comienza a aproximadamente 275°C, que probablemente indica, respectivamente, la transformación de la forma y la fusión o la descomposición o ambas.

Las figura 17 y la figura 18 muestran las isotermas de adsorción y desorción en
10 agua (a 25°C) para la base libre (Fórmula 1) y varias sales de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, incluyendo mono-isetionato (Formas B y D), mono- y di-HCl, mono-mesilato (Formas A y C), di-mesilato y mono-tosilato. Los datos de adsorción y desorción en agua fueron obtenidos usando un analizador gravimétrico simétrico modelo SGA-100 de VTI
15 CORPORATION. Para obtener una isoterma de vapor de agua, fue colocada una muestra de un polimorfo sobre una microbalanza en una cámara ambiental sellada y posteriormente se calentó a una velocidad de 5°C/min hasta que la temperatura en la cámara alcanzó los 40°C. Para obtener un peso seco de la muestra, se permitió al polimorfo equilibrarse a 40°C hasta que la muestra experimentó un cambio de peso de
20 menos de 0,0270% en peso en 2 minutos. Después de secar, la muestra se enfrió a 25°C y posteriormente se expuso a diferentes niveles de humedad en el intervalo de 5 ó 10% de HR al 90% de HR y del 90% de HR al 10 ó 5% de HR, en incrementos de 10% de HR. En cada nivel de humedad, se permitió al polimorfo equilibrarse hasta que la muestra experimentó un cambio de peso de menos de 0,0270% en peso en 2
25 minutos. La masa en equilibrio en cada nivel de humedad fue registrada y, con el peso seco de la muestra, usada para generar una representación del cambio de peso frente a la humedad relativa.

De los compuestos mostrados en la figura 17 y la figura 18, sólo la base libre, la sal de mono-isetionato (Forma B y D) y la sal de mono-tosilato exhiben menos de un
30 cambio del 2% de la masa cuando se exponen a niveles de humedad en el intervalo de 10% de HR al 90% de HR a 25°C.

La tabla 4 enumera la solubilidad en agua de la base libre (su fase más estable de cristal de acuerdo con los experimentos de mezcla) y la sal de isetionato (Forma B, su forma más estable de acuerdo con los resultados de los experimentos de mezcla).
35 Dado que la forma B parece ser la forma de sal de isetionato más estable, debería

exhibir la solubilidad más baja en agua entre las formas salinas de isetionato observadas. Las otras formas salinas de isetionato no fueron evaluadas para la solubilidad metaestable. La solubilidad acuosa para la sal de isetionato fue obtenida disolviendo la sal en agua hasta aproximadamente 300 mg/mL, equilibrando durante 5 aproximadamente 48 h después de cuyo tiempo fueron observados unos sólidos y midiendo la concentración de sal de la fase acuosa usando HPLC. Véase la tabla 5 para una lista de las condiciones del HPLC. La solubilidad acuosa para la base libre fue obtenida equilibrando el sólido en agua durante 14 h y midiendo la concentración de la base libre en la fase acuosa usando un método semiautomatizado UV-vis, que 10 utilizaba un lector de placa de un espectrofotómetro SPECTRMAX PLUS.

Los datos en la tabla 4 indican que la solubilidad en agua de la sal de mono-isetionato (a pH 5,4) es más de 20,000 veces más alta que para la base libre (a pH 7,9). Esta gran disparidad en la solubilidad en agua no puede ser explicada por la diferencia relativamente modesta en el pH de las soluciones saturadas para la base 15 libre y la sal de mono-isetionato. De hecho, la solubilidad teórica en agua de la base libre es sólo 0,62 mgA/mL a pH 5,4 por el cálculo Henderson-Hasselbalch (usando una solubilidad de la base libre de 0,0092 mg/mL, a pH 7,9 y pK_s de 7,3 y 4,1). Sembrando una solución acuosa de la sal de mono-isetionato preparada a 117 mgA/mL, pH 5,4 (supersaturada en lo que concierne a la base libre) con cristales de la 20 base libre no causó precipitación. En cambio, las semillas se disolvieron, indicando alguna capacidad del ión de isetionato de solubilizar la base libre en agua.

Tabla 4. Solubilidad en agua de la base libre y de la sal de isetionato (Forma B)

25	Muestra	Solubilidad, mgA/mL	pH final	Tiempo de equilibrado, h
	Base libre	0,009	7,9	14
	Isetionato	213	5,4	48

30

35

65 *FF*

Tabla 5. Condiciones generales de HPLC para medidas de solubilidad en agua

Variable de control	Valor
Caudal de columna	1 mL/min
Tiempo de Parada	45 minutos
Disolvente A	Acetato 10 mM, pH 5,7
Disolvente B	ACN
Disolvente A/Disolvente B (v/v)	
0 minutos	80/20
30 minutos	25/75
35 minutos	25/75
36 minutos	80/20
45 minutos	80/20
Longitud de onda de detección	260 nm
Volumen de inyección de columna	10 µL
Temperatura de la columna	25°C
Tipo de columna (YMC PAC PRO)	C18 150 x 4,6 mm, 3µ tamaño de partículas

- 5

La solubilidad de la sal de isetionato en solución salina normal es 0,58 mgA/mL, que es mucho menos que su solubilidad en agua y es muy próxima al valor teórico de 0,43 mgA/mL (cálculo Henderson-Hasselbalch) al pH final de esta solución (pH 5,56). En la solución salina normal, el sorprendente poder de solubilización del ión de isetionato desaparece esencialmente y la solubilidad del compuesto se comporta
- 10

más bien como un típico compuesto básico.

La sal de isetionato puede prepararse usando un número de técnicas. Por ejemplo, en un método, una solución de ácido isetiónico y un primer disolvente se mezclan con una mezcla acuosa de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. La mezcla se filtra para eliminar
- 15

cualquier sólido y el filtrado resultante se liofiliza para dar una sal de isetionato amorfa. La sal amorfa se convierte a una forma cristalina disolviéndolo en un segundo disolvente que puede acompañarse calentando para promover la disolución completa. La solución resultante posteriormente se enfría a TA o menos para precipitar una forma cristalina de la sal, que puede aislarse vía filtración y luego secarse en una
- 20

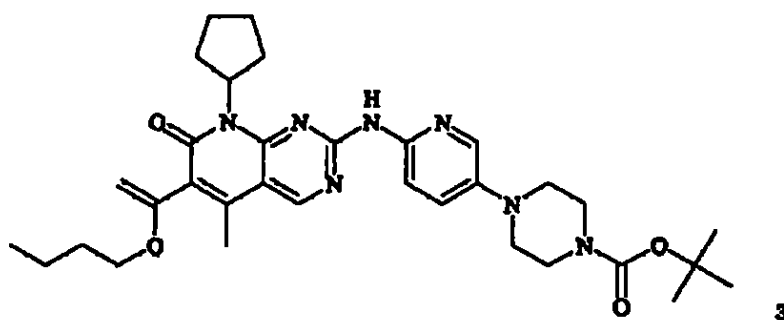
estufa al vacío.

6668

El método generalmente emplea cantidades estequiométricas (es decir, relaciones molares de 1:1 ó 2:1) o casi estequiométricas de ácido isetiónico y 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. Los primeros y segundos disolventes pueden ser los mismos o diferentes y son disolventes típicamente miscibles en agua, incluyendo alcoholes tales como MeOH y EtOH. La cantidad de calor necesario para disolver la sal amorfa en el segundo disolvente dependerá del disolvente usado; pero la temperatura de la mezcla está típicamente en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C y está normalmente en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C. En algunos casos, la temperatura de la mezcla está en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C o aproximadamente de 35°C a aproximadamente 40°C.

En otro método, la base libre (Fórmula 1) se dispersa (mezclada) en un primer disolvente y se siembra con una forma de isetionato cristalina. La mezcla resultante se mezcla con una solución de ácido isetiónico y un segundo disolvente. Típicamente, la solución de ácido isetiónico se añade en múltiples porciones durante un período de tiempo. La mezcla resultante o la dispersión se agitan a TA o inferior, por lo general a una temperatura mayor de aproximadamente 35°C o 40°C. Para mejorar el rendimiento, la mezcla resultante puede enfriarse a una temperatura inferior a aproximadamente 0°C, que precipita en cristales de sal de isetionato adicionales. Los cristales de sal de isetionato pueden ser aislados vía filtración y luego secados en una estufa al vacío. Como el método descrito anteriormente, esta técnica emplea cantidades estequiométricas o casi estequiométricas de ácido isetiónico y 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. Además, los primeros y segundos disolventes pueden ser los mismos o diferentes y son disolventes típicamente miscibles en agua, incluyendo alcoholes tales como MeOH y EtOH. Comparado con el procedimiento antes descrito, este método causa a menudo mejores rendimientos y mejores cristales (por ejemplo, más grandes y más uniformes).

Otro método evita la base libre (Fórmula 1) y genera la sal de isetionato directamente a partir de un intermedio del procedimiento protegido. El método incluye hacer reaccionar un compuesto protegido con N-BOC de Fórmula 3,



con aproximadamente 3,5 equivalentes (o más) de ácido isetiónico en un primer disolvente y agua, que elimina el grupo BOC protector y desenmascara un grupo acetilo para dar una sal de di-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. La reacción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o más alta y a menudo se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C. A esta mezcla de reacción se añade una base impedida (por ejemplo, Et₃N) en un segundo disolvente, formando una sal con el ácido isetiónico que es soluble en la mezcla de reacción. La cantidad de base añadida es suficiente para mantener -en la presencia de la sal de di-isetionato- un leve exceso de ácido isetiónico libre en la mezcla de reacción. Por ejemplo, si 3,5 equivalentes de ácido isetiónico fueron llevados a reaccionar con el compuesto de Fórmula 3 BOC-protégido, podrían usarse aproximadamente 1,45 equivalentes de la base impedida, causando aproximadamente 0,05 exceso de equivalentes del ácido isetiónico libre. De ser deseado, la sal de di-isetionato puede ser aislada por filtración.

Para obtener una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, la base adicional se añade durante un periodo ampliado de tiempo (por ejemplo, gota a gota) para asegurar la formación de la forma de sal de mono-isetionato precisa (por ejemplo, la Forma B). La adición de la base impedida demasiado rápidamente puede causar la formación de otra, polimorfos metaestables. Para mejorar el rendimiento, la mezcla resultante puede enfriarse a una temperatura de aproximadamente 5°C o inferior y luego filtrarse y secarse. Como en los métodos descritos anteriormente, los primeros y segundos disolventes pueden ser los mismos o diferentes y son disolventes miscibles en agua, incluyendo alcoholes tales como MeOH y EtOH.

6587

Las otras formas de sal descritas, por ejemplo, sales mono- o di-HCl, de mesilato, o de tosilato pueden prepararse de una manera similar a los métodos descritos anteriormente para la sal de Isetionato (Fórmula 2).

5 Los compuestos descritos (Fórmula 1 y sales) comprenden todas las variaciones isotópicas farmacéuticamente aceptables. Una variación isotópica es un compuesto en el que al menos un átomo se sustituye por un átomo que tiene el mismo número atómico, pero de una masa atómica diferente de la masa atómica encontrada generalmente en la naturaleza. Isótopos útiles incluyen los isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro. Isótopos ejemplares incluyen
10 así, sin restricción, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl .

La sustitución de los compuestos descritos con isótopos tales como el deuterio, p. ej. ^2H , puede ofrecer ciertas ventajas terapéuticas dando como resultado una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida aumentada *in vivo* o requerimientos de dosificación reducidos y de ahí que pueda ser útil en algunas circunstancias. Además,
15 ciertas variaciones isotópicas, por ejemplo, aquellas que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución de tejido del fármaco y/o del sustrato. Los isótopos radiactivos, como p. ej. el tritio, ^3H y el carbono 14, ^{14}C , son particularmente útiles por esta razón a la vista de su facilidad de incorporación y de los fáciles medios de detección.

20 Las variaciones isotópicas de los compuestos descritos pueden prepararse generalmente por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o por procesos análogos a los descritos en los ejemplos que acompañan que usan variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados. Los solvatos farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos incluyen aquellos en los
25 cuales el disolvente de cristalización puede ser sustituido isotópicamente, por ejemplo, D_2O , d_6 -acetona, d_6 -DMSO.

Los compuestos descritos (Fórmula 1 y sales) pueden administrarse como productos cristalinos o amorfos. Pueden obtenerse, por ejemplo, como rollos sólidos, polvos, o películas por métodos tales como la precipitación, la cristalización, la
30 liofilización, secado por pulverización, o secado por evaporación. El secado por microondas o por radiofrecuencia puede usarse para este propósito.

Los compuestos descritos pueden administrarse solos o en combinación con otros fármacos y generalmente serán administrados como una formulación en asociación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables. El término
35 "excipiente" describe cualquier otro ingrediente que los compuestos representados por

la Fórmula 1 y sus sales. La elección del excipiente dependerá en gran parte del modo particular de administración.

Los compuestos descritos pueden administrarse oralmente. La administración oral puede implicar tragar, de modo que el compuesto entre en el tracto gastrointestinal, o puede emplearse administración bucal o sublingual por la que el compuesto entra en la circulación sanguínea directamente desde la boca.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen formulaciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas que contienen partículas, líquidos o polvos, pastillas (incluyendo rellenas de líquido), gomas de mascar, multi- y nano-partículas, geles, solución sólida, liposoma, películas (incluyendo muco-adhesivos), óvulos, pulverizaciones y formulaciones líquidas. Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Tales formulaciones pueden emplearse como cargas en cápsulas blandas o duras y típicamente comprende un vehículo, por ejemplo, agua, EtOH, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa, o un aceite adecuado y uno o varios agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. También pueden prepararse formulaciones líquidas por la reconstitución de un sólido, por ejemplo, de una bolsita.

Los compuestos descritos pueden usarse también en formas de dosificación de disolución rápida, desintegración rápida tales como las descritos en Liang y Chen *Expert Opinion in Therapeutic Patents* (2001) 11(8):981-986.

Para formas de dosificación de comprimido, dependiendo de la dosis, el fármaco puede prepararse a partir de 1% en peso a 80% en peso de la forma de dosificación, más típicamente de 5% en peso a 60% en peso de la forma de dosificación. Además del fármaco, los comprimidos contienen generalmente un agente disgregante. Los ejemplos de agentes disgregantes incluyen glicolato de almidón de sodio, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa sustituida por alquilo inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato de sodio. Generalmente, el agente disgregante comprenderá de 1% en peso a 25% en peso, preferiblemente de 5% en peso a 20% en peso de la forma de dosificación.

Los aglomerantes generalmente se usan para impartir cualidades cohesivas a una formulación de comprimido. Aglomerantes adecuados incluyen celulosa microcristalina, gelatina, azúcares, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, gomas naturales y sintéticas, almidón pregelatinizado, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.

Los comprimidos pueden contener también diluyentes, tales como lactosa (monohidrato, monohidrato secado por pulverización, anhidro y similares), manitol, xilitol, dextrosa, sacarosa, sorbitol, celulosa microcristalina, almidón y dihidrato de fosfato de calcio dibásico.

5 Los comprimidos opcionalmente pueden incluir también a agentes tensioactivos tales como lauril-sulfato de sodio y polisorbato 80 y deslizantes tales como el dióxido de silicio y el talco. Cuando están presentes, los agentes tensioactivos pueden comprender de 0,2% en peso a 5% en peso del comprimido y pueden comprender deslizantes de 0,2% en peso a 1% en peso del comprimido.

10 Los comprimidos generalmente también contienen lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, estearil-fumarato de sodio y mezclas de estearato de magnesio con lauril-sulfato de sodio. Los lubricantes generalmente comprenden de 0,25% en peso a 10% en peso, preferiblemente de 0,5% en peso a 3% en peso del comprimido. Otros ingredientes pueden incluir
15 conservantes, antioxidantes, aromatizantes y colorantes.

Las mezclas de comprimido pueden ser comprimidas directamente para formar comprimidos. Las mezclas de comprimido o las porciones de mezclas pueden mojarse-, secarse- o fundirse-granularse, fundirse-coagularse, o extrudarse de forma alternativa antes de comprimirse. La formulación final puede comprender una o varias
20 capas y puede ser revestida o no revestida. Comprimidos ejemplares contienen hasta aproximadamente el 80% de fármaco, de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 90% en peso de aglomerante, de aproximadamente 0% en peso a aproximadamente 85% en peso de diluyente, de aproximadamente 2% en peso a aproximadamente 10% en peso de agente disgregante y de aproximadamente 0,25%
25 en peso a aproximadamente 10% en peso de lubricante. Para detalles adicionales acerca de la formulación de comprimidos, véase H. Lieberman and L. Lachman, *Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets, Vol. 1* (1980).

Formulaciones sólidas para la administración oral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificadas
30 incluyen liberación retrasada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. Para una descripción general de formulaciones de liberación adecuadas modificadas, véase la patente de EE.UU. N°. 6.106.864. Para detalles de otras tecnologías de liberación útiles, tales como dispersiones de alta energía y osmóticas y partículas revestidas, véase Verma *et al.*, *Pharmaceutical Technology On-line* (2001) 25(2):1-14.

Para una discusión del uso de goma de mascar para alcanzar liberación controlada, véase el documento WO 00/35298.

Los compuestos descritos (Fórmula 1 y sales) pueden administrarse también directamente en la circulación sanguínea, en el músculo o en un órgano interno. El medio adecuado para la administración parenteral incluye intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Dispositivos adecuados para la administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microaguja), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

Formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes de tampón (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero para algunas aplicaciones pueden ser formuladas más adecuadamente como una solución estéril no acuosa o como una forma seca para usarse en conjunción con un vehículo adecuado tal como agua estéril y libre de pirógeno. La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por liofilización, puede lograrse fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

La solubilidad de los compuestos descritos usados en la preparación de soluciones parenterales puede ser aumentada por el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes que realzan la solubilidad. Las formulaciones para la administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada como se describe anteriormente. Así, los compuestos descritos pueden formularse en una forma más sólida para la administración como un depósito implantado que proporcione la liberación a largo plazo del compuesto activo.

Los compuestos de la invención pueden ser administrados también tópicamente a la piel o en la mucosa, dermalmente o transdérmicamente. Formulaciones típicas por esta vía incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, ungüentos, polvos de talco, preparaciones, espumas, películas, parches de la piel, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendas y microemulsiones. También pueden usarse liposomas. Vehículos típicos incluyen alcohol, agua, aceite mineral, vaselina neutra líquida, vaselina neutra blanca, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. Formulaciones tópicas pueden incluir también potenciadores de penetración. Véase, por ejemplo, Finnin y Morgan, *J. Pharm. Sci.* (1999) 88 (10):955-958.

Otro medio de administración tópica incluye el suministro por iontoforesis, electroporación, fonoforesis, sonoforesis y sin aguja (por ejemplo, POWDERJECT) o por inyección con microaguja. Las formulaciones para la administración tópica pueden ser formuladas para ser de liberación inmediata y/o modificada como se describe anteriormente.

Los compuestos descritos también pueden administrarse por la nariz o por inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (solo, como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa, o como unas partículas de componentes mixtas, por ejemplo, mezcladas con fosfolípidos) de un inhalador seco en polvo o como un pulverizador de aerosol de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferiblemente un atomizador que usa electrohidrodinámica para producir una niebla fina), o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorofluorometano. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador, atomizador, o nebulizador contienen una solución o suspensión que comprende el compuesto activo, un agente para la dispersión, para la solubilización o para la liberación extendida del compuesto activo (por ejemplo, EtOH o EtOH acuoso), uno o varios disolventes que sirven como un propulsor y un tensioactivo opcional tal como trioleato de sorbitán o un ácido oligoláctico.

Antes del uso en una formulación de polvo seco o suspensión, el producto de fármaco se microniza a un tamaño adecuado para el suministro por inhalación (típicamente en menos de 5 micras). Esto puede lograrse por cualquier método de pulverización apropiado, tal como por micronización de chorro en espiral, micronización de chorro en lecho fluidizado, procesamiento de fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

Las cápsulas, ampollas y cartuchos (preparados, por ejemplo, a partir de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) para uso en un inhalador o insuflador pueden ser formulados para contener una mezcla en polvo del compuesto activo, una base adecuada en polvo tal como la lactosa o el almidón y un modificante del funcionamiento tal como la L-leucina, el manitol o el estearato de magnesio. La lactosa puede ser anhidra o preferiblemente monohidratada. Otros excipientes adecuados incluyen dextrano, glucosa, maltosa, sorbitol, xilitol, fructosa, sacarosa y trehalosa.

Una formulación de solución adecuada para uso en un atomizador que usa electrohidrodinámica para producir una niebla fina puede contener de 1 µg a 20 mg del compuesto de la invención por impulsión y el volumen de impulsión puede variar de 1 µl a 100 µl. Una formulación típica puede comprender un compuesto de Fórmula 1 o

Fórmula 2, propilenglicol, agua estéril, EtOH y NaCl. Disolventes alternativos, que pueden usarse en vez de propilenglicol, incluyen polietilenglicol y glicerol.

Las formulaciones para la administración inhalada/intranasal pueden ser formuladas para ser liberadas inmediatamente y/o modificadas usando, por ejemplo, ácido poli-DL-láctico-co-glicólico (PGLA). Aromatizantes adecuados, tales como mentol y levomentol, o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina de sodio pueden ser añadidos a formulaciones intencionadas para la administración inhalada/intranasal.

En el caso de inhaladores de polvo seco y aerosoles, la unidad de dosificación se determina mediante una válvula que suministra una cantidad medida. Típicamente, unidades conforme a la invención se distribuyen para administrar una dosis medida o "soplo" que contiene de 100 a 1000 μg del ingrediente farmacéutico activo. La dosis total diaria típicamente estará en el intervalo de 100 μg a 10 mg que puede ser administrada en una dosis sola o, más por lo general, como dosis divididas a lo largo del día.

Los compuestos activos pueden administrarse por vía rectal o por vía vaginal, por ejemplo, en la forma de un supositorio, pesario o enema. La mantequilla de cacao es una base de supositorio tradicional, pero pueden usarse otras alternativas como apropiadas. Las formulaciones para la administración rectal/vaginal pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o modificada como se describe anteriormente.

Los compuestos descritos también pueden administrarse directamente al ojo o al oído, típicamente en forma de gotas de una suspensión micronizada o solución salina isotónica, ajustada en el pH y estéril. Otras formulaciones adecuadas para administración ocular y auditiva incluyen ungüentos, implantes biodegradables (por ejemplo, esponjas de gel absorbibles, colágeno) y no biodegradables (por ejemplo, silicona), obleas, lentes y sistemas de partículas o vesiculares, tales como niosomas o liposomas. Un polímero tal como ácido poliacrílico entrecruzado, poli(alcohol vinílico), ácido hialurónico, un polímero celulósico (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa o metilcelulosa), o un polímero heteropolisacárido (por ejemplo, goma gellan), puede ser incorporado junto con un conservante, tal como el cloruro de benzalconio. Tales formulaciones pueden también ser suministradas por iontoforesis. Las formulaciones para la administración ocular/auditiva pueden ser formuladas para ser de liberación inmediata y/o modificada como se describe anteriormente.

Los compuestos descritos pueden ser combinados con entidades macromoleculares solubles tales como ciclodextrina o polímeros que contienen

74

- polietilenglicol para mejorar su solubilidad, velocidad de disolución, enmascaramiento del sabor, biodisponibilidad y/o estabilidad. Los complejos de ciclodextrina de fármaco, por ejemplo, son encontrados que son generalmente útiles para la mayor parte de las formas de dosificación y vías de administración. Pueden usarse tanto complejos de
- 5 inclusión como de no inclusión. Como una alternativa para dirigir la complejación con el fármaco, puede usarse la ciclodextrina como aditivo auxiliar, es decir, como vehículo, diluyente o solubilizador. Las alfa-, beta - y gamma- ciclodextrinas se usan comúnmente para estos objetivos. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patentes Internacionales WO 91/11172, WO 94/02518 y WO 98/55148.
- 10 La dosis terapéuticamente eficaz de los compuestos de Fórmula 1, Fórmula 2 u otras sales variará de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg por peso de cuerpo y por día. Dosis típicas adultas serán aproximadamente de 0,1 mg a aproximadamente 3000 mg por día. La cantidad de componente activo en una preparación de dosis de una unidad puede ser variada o ajustada de
- 15 aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,6 mg a 100 mg de acuerdo con la aplicación particular y la potencia del componente activo. La composición puede, de ser deseado, contener también otros agentes terapéuticos compatibles. A un sujeto en necesidad de tratamiento se le administra una dosificación de aproximadamente 0,6 a
- 20 aproximadamente 500 mg por día, separadamente o en múltiples dosis durante un período de 24 horas. Tal tratamiento puede ser repetido en intervalos sucesivos para tanto tiempo como sea necesario.

EJEMPLOS

25

Los ejemplos siguientes pretenden ser ilustrativos y no restrictivos y pretenden representar realizaciones específicas de la presente invención.

- EJEMPLO 1. Preparación del éster *tert*-butilico del ácido 4-[6-(6-bromo-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidro-pirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino)-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico.
- 30

- Se calentó una suspensión de 6-bromo-8-ciclopentil-2-metansulfonil-5-metil-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona (10,00 g, 0,027 mol, preparados como en el Ejemplo 6 del documento WO 01/707041, que se incorpora en este documento como referencia) y
- 35

10,37 g (0,0373 mol) del éster *terc*-butilico del ácido 4-(6-amino-piridin-3-il)-piperazin-1-carboxílico en tolueno (100 mL) en atmósfera de nitrógeno en un baño de aceite durante 7 horas. La cromatografía de capa fina (SiO₂, 10% de MeOH/DCM) indicó la presencia de ambos materiales de partida. La suspensión se calentó bajo reflujo durante 18 horas adicionales. La suspensión resultante se enfrió a TA y se filtró para dar el éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-(6-bromo-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino)-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico (5,93 g, 38%). Punto de fusión > 250°C. MS (APCI) M⁺+1: calculado, 584,2, encontrado, 584,2.

10 EJEMPLO 2. Preparación del éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-[8-ciclopentil-6-(1-etoxivinil)-5-metil-7-oxo-7,8-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico

Una suspensión del éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-(6-bromo-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino)-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico (5,93 g, 0,010 mol, preparados como en el Ejemplo 1), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (1,40 g, 0,00121 mol) y tributil(1-etoxivinil)tin (5,32 mL, 0,0157 mol) en tolueno (30 mL) se calentó bajo reflujo durante 3,5 horas. La mezcla se enfrió y se filtró para dar un sólido. La purificación del sólido por cromatografía de gel de sílice usando un gradiente de acetato de etilo/hexano del 5%-66% en 15 minutos dió el éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-[8-ciclopentil-6-(1-etoxivinil)-5-metil-7-oxo-7,8-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico como una espuma amarilla (4,50 g, 78 %). MS (APCI) M⁺+1: calculado 576,2, encontrado, 576,3.

25 EJEMPLO 3. Preparación de hidrocloruro de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona

Se burbujeó gas cloruro de hidrógeno en una solución enfriada en baño de hielo del éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-[8-ciclopentil-6-(1-etoxivinil)-5-metil-7-oxo-7,8-dihidropirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico (4,50 g, 0,00783 mol, preparado como en el Ejemplo 2) en DCM (100 mL). La suspensión resultante fue taponada y agitada a TA de la noche a la mañana y entonces fue diluida con dietiléter (200 mL). El sólido se recogió por filtración, se lavó con dietiléter y se secó para dar la sal de hidrocloruro de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona como un sólido amarillo (4,01 g, 92%).

76

Punto de fusión 200°C. HPLC, C18 fase inversa, gradiente del 10%-95% de 0,1% de TFA/CH₃CN en 0,1% de TFA/H₂O durante 22 minutos: 99,0% a 11,04 minutos. MS (APCI) M⁺+1: calculado, 448,2, encontrado, 448,3. Anal. calculado para C₂₄H₂₈N₇O₂ 2,4H₂O-1,85HCl: C, 51,64; H, 6,44; N, 17,56, Cl (total), 11,75. Encontrado: 5 C, 51,31; H, 6,41; N, 17,20; Cl (total), 12,11.

EJEMPLO 4. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma B)

10 A una mezcla de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (7,0 g, 15,64 mmol, preparados como en el Ejemplo 3 después del contacto con NaOH) dispersada en 250 ml de agua se añadió gota a gota 30 mL de una solución 0,52 M de ácido isetiónico en MeOH (15,64 mmol) a un pH de 5,2. La solución se filtró por un filtro de vidrio (fino) y la solución clara se
15 liofilizó para dar 9,4 g de la sal amorfa. La sal amorfa (3,16 g) se mezcló con 25 mL de MeOH y después de la disolución casi completa se formó un nuevo precipitado. Se añadieron otros 25 mL de MeOH y la mezcla se agitó de 46°C a 49°C durante cuatro horas. La mezcla se enfrió despacio a 32°C y se puso en un cuarto frío (+4°C) de la noche a la mañana. Se tomó una muestra para PXRD, que indicó la formación de la
20 Forma B. La mezcla se filtró y el precipitado se secó de la noche a la mañana a 50°C en una estufa al vacío. Esto supuso 2,92 g de la sal de mono-isetionato del compuesto de Fórmula 1 con un rendimiento del 92%. HPLC - 99,25%. PXRD - Forma B, CHNS, H-RMN fueron compatibles con la estructura.

25 **EJEMPLO 5. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma D)**

Se colocó MeOH (100 mL) en un matraz de 250 mL equipado con un agitador mecánico, termopar/regulador, condensador y manta calefactora y se precalentó a
30 35°C. Una sal de isetionato amorfa (2 g, preparada como en el Ejemplo 4) se añadió despacio en tres partes con un intervalo de 25 minutos a 30 minutos entre las adiciones. La mezcla de reacción se agitó de la noche a la mañana a 35°C y posteriormente se enfrió. Una muestra se filtró y se examinó por PXRD. Era la Forma B pura. La mezcla de reacción entera fue usada entonces como semillas de la Forma
35 B en un experimento a escala más grande.

77

EJEMPLO 6. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-pirimidin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma B)

5 Se colocó MeOH (50 mL) en un matraz de 250 mL equipado con un agitador magnético, condensador, termopar/regulador y manta de calentamiento y se precalentó a 40°C. Se añadió despacio una sal de isetionato amorfa (1 g, preparada como en el Ejemplo 4) en tres partes con un intervalo de 30 minutos entre las partes y luego se agitó de la noche a la mañana a 40°C. La reacción fue controlada por espectroscopia Raman *in situ*. La muestra se tomó, se filtró y se analizó por PXRD. Era la Forma B pura por PXRD y por espectroscopia Raman. La mezcla se enfrió a 25°C a una velocidad de 3°C/h, se enfrió a -10°C, se filtró y se secó al vacío para dar 0,85 g del producto cristalino de la Forma B.

15 **EJEMPLO 7. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma B)**

 Se mezcló la base libre (Fórmula 1, 0,895 mg, 2 mmol) con 10 mL de MeOH y se sembró con 33 mg de una sal de mono-isetionato del compuesto de Fórmula 1 (Forma B). Entonces fueron añadidos 5,6 mL de una solución 0,375 M de ácido isetiónico en MeOH (2,1 mmol) en hasta 10 porciones en un período de tiempo de 75 minutos. La mezcla se agitó durante una hora adicional y se tomó una muestra para el análisis PXRD. Esto confirmó la formación de la Forma B cristalina. La mezcla se agitó a TA de la noche a la mañana y se tomó otro PXRD. No hubo ningún cambio de la forma cristalina. La mezcla se enfrió en un refrigerador a -8°C de la noche a la mañana, se filtró y se secó a 50°C en una estufa al vacío para dar 1,053 g (91,8% de teoría) del compuesto susodicho (Forma B). HPLC -99,8%, CHNS, H-RMN, IR son consistentes con la estructura, PXRD - Forma B.

30 **EJEMPLO 8. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma A)**

 Se mezcló una sal de isetionato amorfa (47 mg preparados como en el Ejemplo 4) con 4 mL de EtOH en un matraz de 15 mL equipado con un agitador magnético, termopar y condensador. La mezcla se calentó al reflujo, lo que causó la formación de

una solución casi clara. Después del reflujo durante 10-15 minutos, la mezcla se enturbió. Se enfrió despacio a 50°C y se sembró a 69°C con la Forma A. La mezcla se mantuvo a 50°C durante 5 h y se permitió enfriar a TA de la noche a la mañana. La mezcla se enfrió posteriormente a 1°C con un baño de hielo, se mantuvo durante 1,5 h, se filtró, se lavó con 0,5 mL de EtOH frío, se secó al aire y luego se secó en una estufa al vacío a 70°C de la noche a la mañana para dar 38,2 mg de un material cristalino fino. Se encontró que el material cristalino era la Forma A de la sal de mono-isetionato por PXRD. El H-RMN fue consistente para la sal de mono-isetionato e indicó la presencia de EtOH residual en aproximadamente 5,9% en mol o 0,6% en peso.

10

EJEMPLO 9. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma D)

Se mezcló una sal de isetionato amorfa (9,0 g, preparada como en el Ejemplo 4) con 300 mL de MeOH, se agitó y se calentó a 63,8°C (a reflujo). A la mezcla ligeramente turbia se le añadieron dos partes de 50 mL de MeOH. La mezcla caliente se filtró en un matraz de 2 L equipado con un agitador mecánico. La mezcla se calentó brevemente a reflujo y luego se enfrió a 60°C. Se añadió IPA (100 mL) a la mezcla. La mezcla se calentó de nuevo a 60°C y se añadieron 110 mL adicionales de IPA. Comenzó a formarse un precipitado a 59,7°C. La mezcla se calentó de nuevo a 67,5°C, se enfrió a 50°C y se mantuvo de la noche a la mañana. Se tomó una muestra a la mañana siguiente para el análisis PXRD. La mezcla se enfrió a 25°C a una velocidad de 3°C/h y se tomó otra muestra de PXRD cuando la mezcla alcanzó los 28°C. Se permitió a la mezcla enfriarse a TA de la noche a la mañana. Se recogió un precipitado y se secó en una estufa al vacío a 65°C y 30 Torr. El procedimiento produjo 7,45 g (rendimiento del 82,8%) del compuesto cristalino (Forma D por el análisis PXRD). Las muestras antes analizadas fueron también la Forma D. El HPLC mostró una pureza del 98,82% y el microanálisis de CHNS estuvo dentro de +/-0,4%. Una mezcla de la Forma A, B y D de la sal de Isetionato en MeOH proporcionó la Forma B sustancialmente pura en menos de tres días.

25
30

EJEMPLO 10. Preparación de ácido isetiónico (ácido 2-hidroxi-etanosulfónico)

Se cargó un matraz de fondo redondo de 5 L con cuatro bocas equipado con un agitador mecánico, termopar, suministrador de gas y ventilación a la atmósfera por

35

una trampa de agua con 748 g (5,05 mol) de isetonato de sodio (ALDRICH) y 4 L de IPA. La mezcla se agitó a TA. Se usó un baño de hielo para mantener la temperatura interna por debajo de 50°C al tiempo que se insuflaron 925 g (25,4 mol) de gas cloruro de hidrógeno (ALDRICH) en el sistema a una velocidad tal que se disolvió tan rápido como fue añadido (como se observó por la carencia de burbujeo por la trampa de agua). Fue añadido gas HCl suficiente hasta que el sistema fue saturado (como se observó por el principio de burbujeo por la trampa de agua). Durante la adición de HCl, la temperatura subió a 45°C. La mezcla se enfrió a TA y se filtró sobre un filtro frito-groso. La torta se lavó con 100 mL de IPA y el filtrado turbio se filtró a través de un filtro de 10-20 μ . El filtrado resultante claro, sin color, fue concentrado bajo presión reducida en un evaporador rotatorio, manteniendo la temperatura del baño por debajo de 50°C. Se diluyeron los 1,07 kg resultantes del aceite ligero amarillo claro con 50 mL de agua del grifo y 400 mL de tolueno y se concentraron bajo presión reducida en un evaporador rotatorio durante tres días, manteniendo la temperatura del baño por debajo de 50°C. Los resultantes 800 g de aceite ligero amarillo claro fueron diluidos con 500 mL de tolueno y 250 mL de IPA y se concentraron bajo presión reducida en un evaporador rotatorio durante 11 días, manteniendo la temperatura del baño por debajo de 50°C. Los resultantes 713 g del aceite ligero amarillo claro fueron titulados en 81% en peso (580 g, rendimiento del 91,1%) conteniendo 7,9% en peso de agua y 7,5% en peso de IPA.

EJEMPLO 11. Preparación del éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-[6-(1-butoxi-vinil)-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidro-pirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico

Un matraz de fondo redondo de 5 L y tres bocas equipado con un agitador mecánico, un termopar y una entrada/salida de nitrógeno conectada a través de un burbujeador de aceite de silicona fue colocado bajo una atmósfera de nitrógeno y cargado con éster *terc*-butilico del ácido 4-[6-(6-bromo-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidro-pirido[2,3-*d*]pirimidin-2-ilamino)-piridin-3-il]-piperazin-1-carboxílico (300 g, 0,51 mol, preparado como en el Ejemplo 2), vinil-butil-éter (154 g, 1,54 mol, ALDRICH), *n*-butanol (1,5 L, ALDRICH) y diisopropil etilamina (107 mL, 0,62 mol, ALDRICH). La mezcla fue colocada bajo un vacío de aproximadamente 50 Torr y luego fue rellena con nitrógeno 3 veces. A esto fueron añadidos 8,3 g (0,01 mol) de dicloruro diclorometano de bis-(difenilfosfinoferroceno)-paladio (JOHNSON MATTHEY, Lote

077598001) y la mezcla resultante fue purgada tres veces adicionales como se describe anteriormente. La mezcla entonces se calentó a 95°C y se agitó durante 20 h. La mezcla resultante fina y roja fue diluida con 2 L de heptano y enfriada a aproximadamente 5°C. A esta temperatura, se añadieron 400 mL de carbonato de potasio acuoso saturado y la mezcla se filtró y se aclaró con 250 mL de heptano. Después de secar en una estufa durante 16 h a 45°C, se obtuvieron 231,7 g (rendimiento del 75%) del compuesto del título como un sólido amarillo.

EJEMPLO 12. Preparación de una sal de mono-isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Forma B)

Un matraz de fondo redondo de 22 L y tres bocas equipado con un agitador mecánico, un termopar y una entrada/salida de nitrógeno conectada a través de un burbujeador de aceite de silicona se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno y se cargo con éster *terc*-butilico del ácido 4-{6-[6-(1-butoxi-vinil)-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidro-pirido-[2,3-d]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il}-piperazin-1-carboxílico (725 g, 1,20 mol, preparado como en el Ejemplo 11) y MeOH (14 L). La mezcla se agitó a TA según fue cargada con una solución de ácido isetiónico (530 g, 4,20 mol, preparado como en el Ejemplo 10), MeOH (1,5 L) y agua (70 mL, 3,89 mol). La mezcla resultante se calentó a 55°C en 30 minutos y luego se agitó a 55°C durante 30 minutos. Una solución de 175 g (1,73 mol) de Et₃N (ALDRICH) en 200 mL de MeOH fue cargada a la mezcla según fue enfriada a 30°C. La mezcla se mantuvo a 30°C al tiempo en el que se añadió una solución de 128 g (1,26 mol) de Et₃N en 2 L de MeOH gota a gota durante 6 horas. La mezcla resultante fue analizada para determinar la forma del cristal (Forma B). La mezcla se enfrió y se mantuvo a 5°C durante 15 minutos y posteriormente se filtró por un filtro frito grueso. La torta de filtro resultante fue lavada con múltiples lavados de 200 mL de MeOH frío. El producto sólido se secó a 55°C bajo el vacío para proporcionar 710 g (rendimiento del 91%) del compuesto del título como cristales amarillos.

30

Debe ser entendido que la descripción anterior pretende ser ilustrativa y no restrictiva. Muchas realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica en la lectura de la descripción anterior. El alcance de la invención, por lo tanto, debe ser determinado no con referencia a la descripción anterior, pero si, en cambio, debe ser determinado con referencia a las reivindicaciones añadidas, junto con el alcance

35

completo de equivalentes a los que tales reivindicaciones dan derecho. Las descripciones de todos los artículos y las referencias, incluyendo las patentes, las solicitudes de patente y las publicaciones de patente, son incorporados en este documento como referencia en su totalidad y para todos los objetivos.

REIVINDICACIONES

1. Una sal de isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona.
- 5
2. La sal de isetionato de la reivindicación 1 que comprende una sal de mono-isetionato de la Forma A.
3. La sal de isetionato de la reivindicación 1 que comprende una sal de mono-
- 10 isetionato de la Forma B.
4. La sal de isetionato de la reivindicación 1 que comprende una sal de mono-isetionato de la Forma D.
- 15
5. Una forma de dosificación farmacéutica que comprende una sal de isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20
6. Un método para preparar una sal de isetionato cristalina de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, comprendiendo el método:
- combinar una solución de ácido isetiónico y un primer disolvente con una dispersión de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona y agua para producir una primera mezcla;
- 25 liofilizar la primera mezcla para dar una sal amorfa;
- mezclar la sal amorfa con un segundo disolvente para producir una segunda mezcla que incluye una sal de isetionato cristalina de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, siendo el segundo disolvente el mismo o diferente que el primer disolvente; y
- 30 opcionalmente calentar la segunda mezcla, refrigerar la segunda mezcla, o calentar y refrigerar la segunda mezcla.
7. Un método para preparar una sal de isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona que
- 35 comprende:

proporcionar un cristal de semilla de una forma de sal de Isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona;

- añadir el cristal de semilla a una dispersión de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona y un primer disolvente
5 para producir una primera mezcla;

combinar la primera mezcla con una solución de ácido Isetiónico y un segundo disolvente para producir una segunda mezcla que incluye la sal de Isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona; y

- 10 opcionalmente, calentar la segunda mezcla, enfriar la segunda mezcla, o calentar y enfriar la segunda mezcla.

8. El método de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que los primeros y segundos disolventes son miscibles en agua.

15

9. El método de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que los primeros y segundos disolventes son alcoholes.

10. El método de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que los primeros y segundos
20 disolventes son MeOH.

11. El método de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que la primera mezcla o la segunda mezcla, respectivamente, se producen por combinación de cantidades aproximadamente equimolares de ácido Isetiónico y 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona.
25

12. El método de la reivindicación 6 ó 7 que comprende además agitar la segunda mezcla a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 30°C a aproximadamente 60°C.

30

13. El método de la reivindicación 6 ó 7 que comprende además refrigerar la segunda mezcla a una temperatura de o por debajo de aproximadamente 0°C.

14. Un método para preparar una sal de isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, comprendiendo el método:

5 hacer reaccionar el éster *terc*-butilico del ácido 4-(6-[6-(1-butoxi-vinil)-8-ciclopentil-5-metil-7-oxo-7,8-dihidro-pyrido-[2,3-d]pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-il)-piperazin-1-carboxílico con el ácido isetiónico en un primer disolvente y agua para dar una mezcla que incluye una sal de di-Isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona.

10 15. El método de la reivindicación 14, que comprende además añadir una base impedida a la mezcla de reacción para dar una sal de mono-isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona.

15 16. Un método para tratar un trastorno o una condición en un mamífero, incluyendo a un ser humano, causado por la proliferación de células anormales, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad de una sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o una condición.

20

17. El método de la reivindicación 16 en el que el trastorno o la condición es la proliferación de músculo vascular liso asociada con aterosclerosis, estenosis postquirúrgica vascular y reestenosis o endometriosis.

25 18. El método de la reivindicación 16 en el que la proliferación de células anormales es cáncer.

30 19. Un método para tratar un trastorno o una condición en un mamífero, incluyendo a un ser humano, causado por infecciones vitales o micóticas, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad de una sal de isetonato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o una condición.

88

20. Un método, para tratar una enfermedad autoinmune en un mamífero, incluyendo a un ser humano comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad de una sal de Isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que es eficaz en el tratamiento de la enfermedad autoinmune.

21. El método de la reivindicación 20, en el que la enfermedad autoinmune es psoriasis, artritis reumatoide de tipo inflamatoria, lupus, diabetes tipo I, nefropatía diabética, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, rechazo de trasplante, incluyendo la enfermedad injerto-contra-huésped.

EXTRACTO

Descritos son polimorfos de la sal de isetionato de 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-
2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-il-amino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona, que es un inhibidor
5 de quinasas selectivas dependientes de ciclina 4 (CDK4) útil para tratar enfermedades
inflamatorias y proliferativas de célula tales como el cáncer y la reestenosis.

878

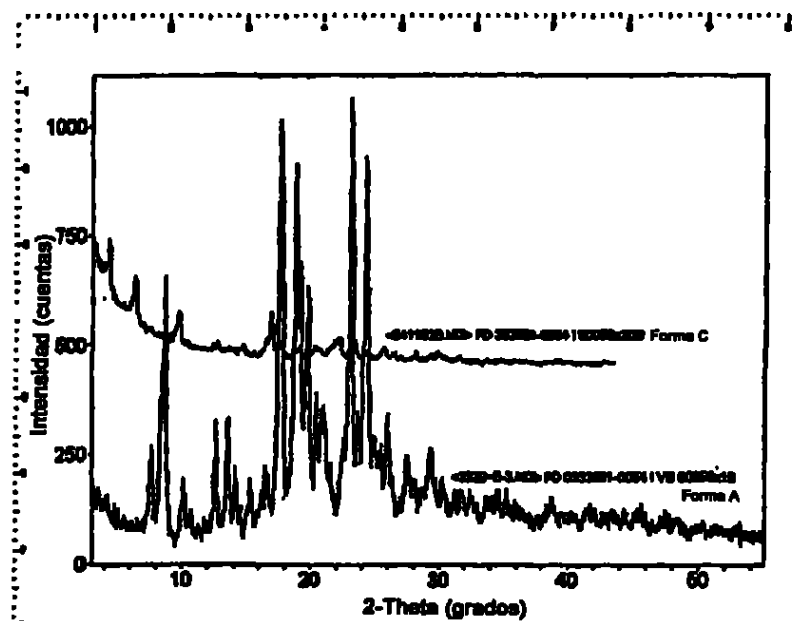


FIGURA 1

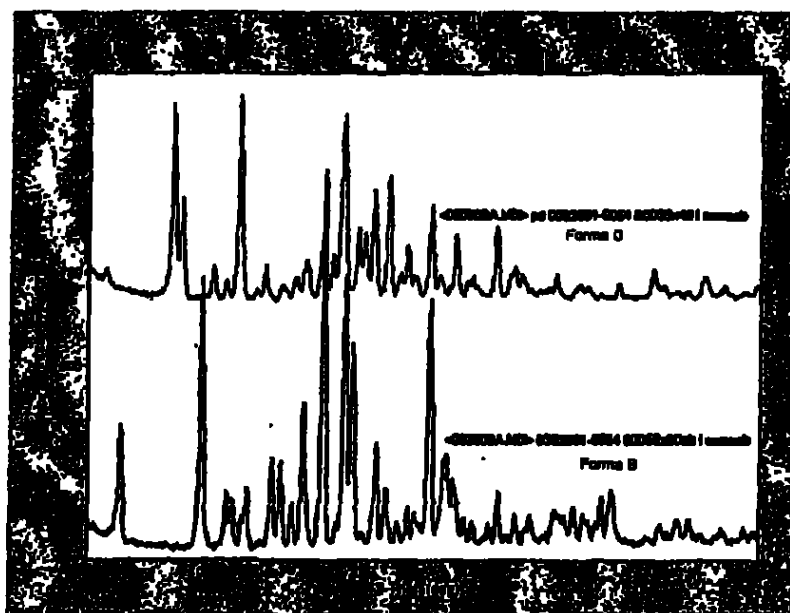


FIGURA 2

88/87

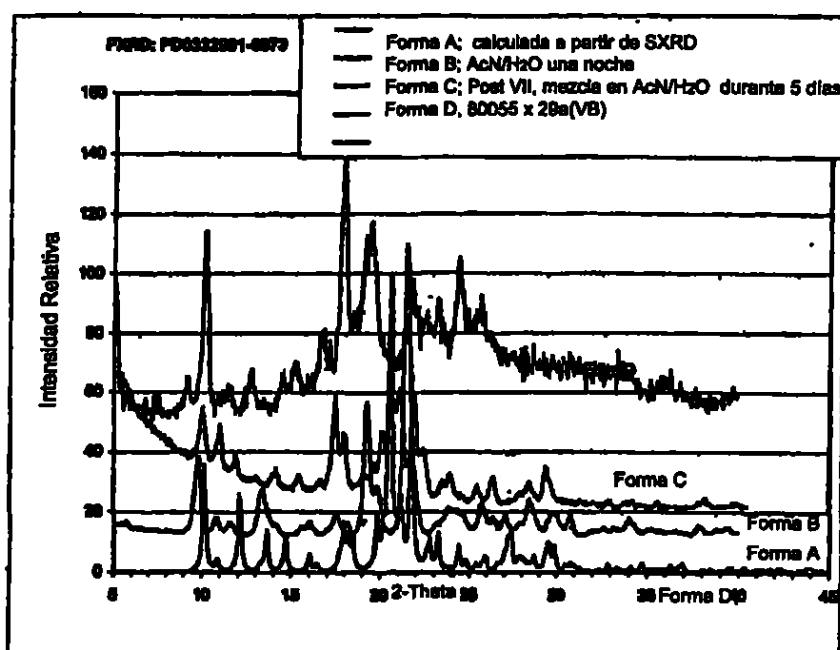


FIGURA 3

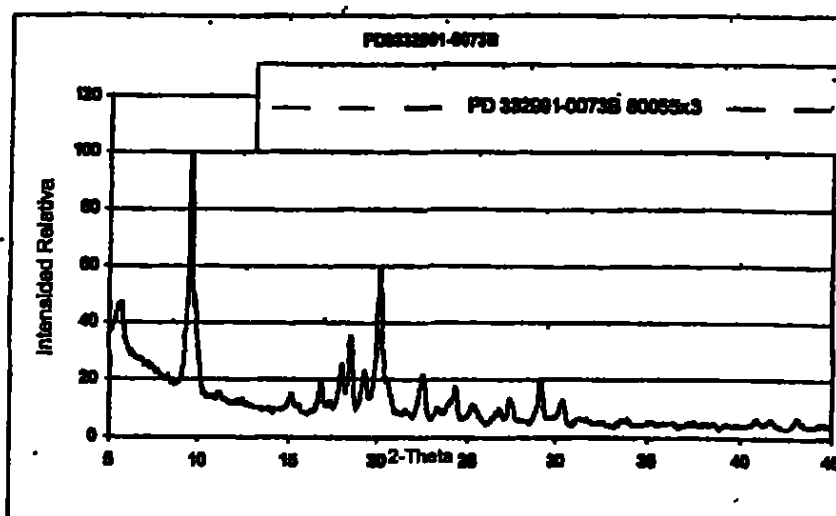


FIGURA 4

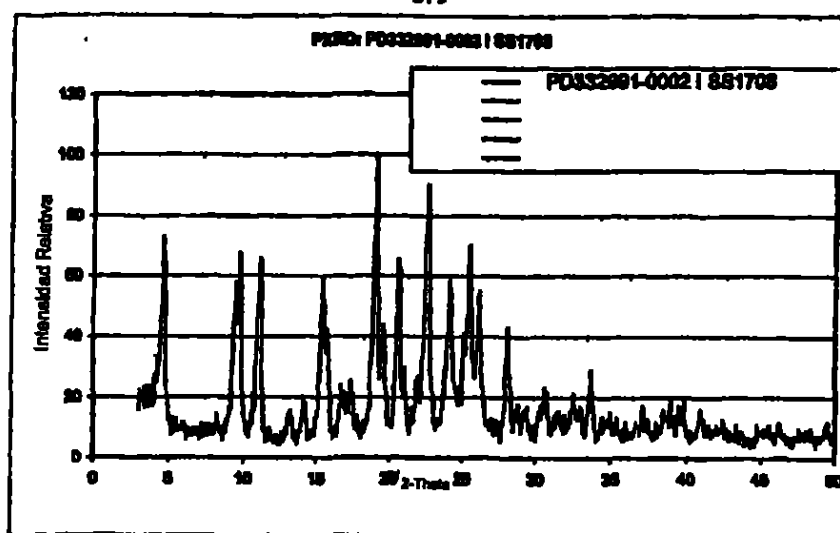


FIGURA 5

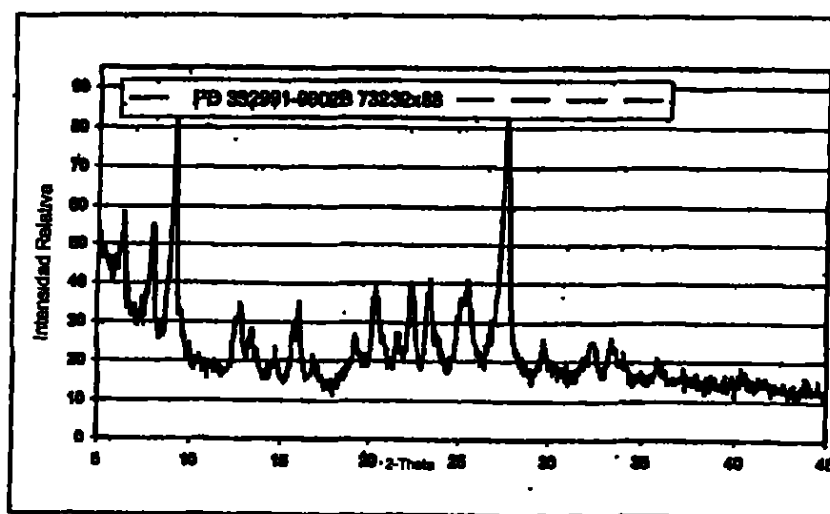


FIGURA 6

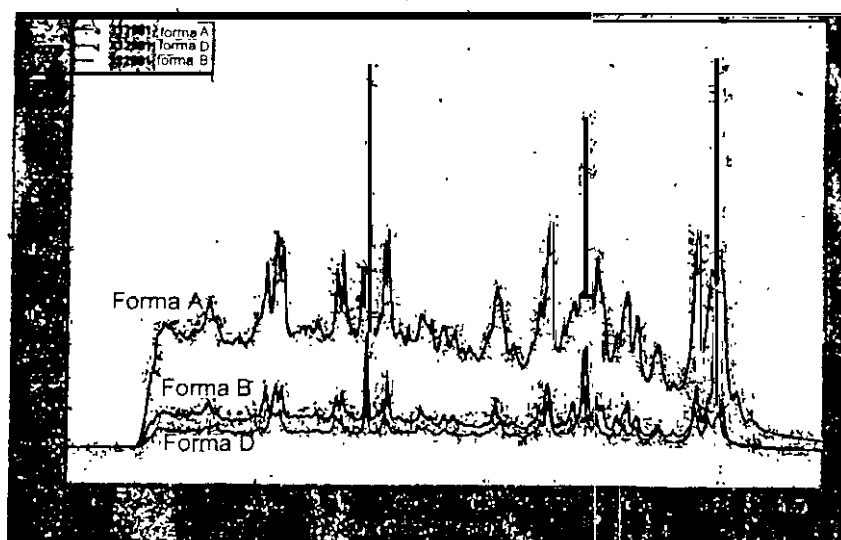


FIGURA 7

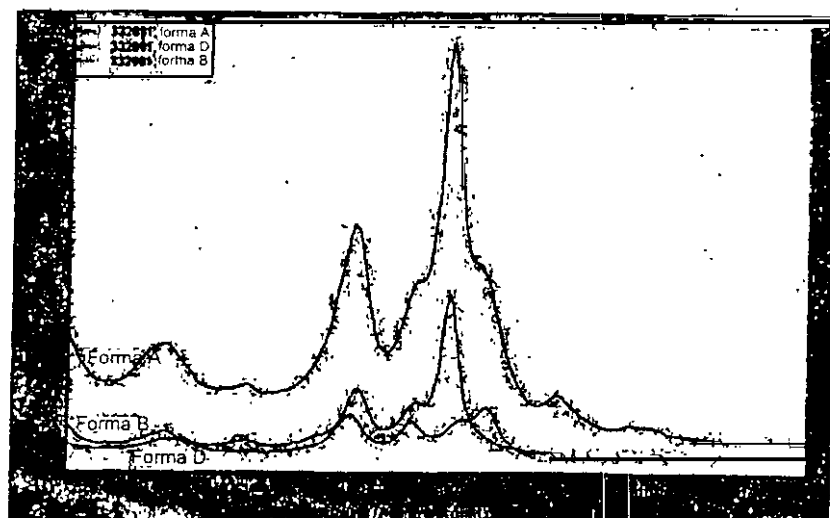


FIGURA 8

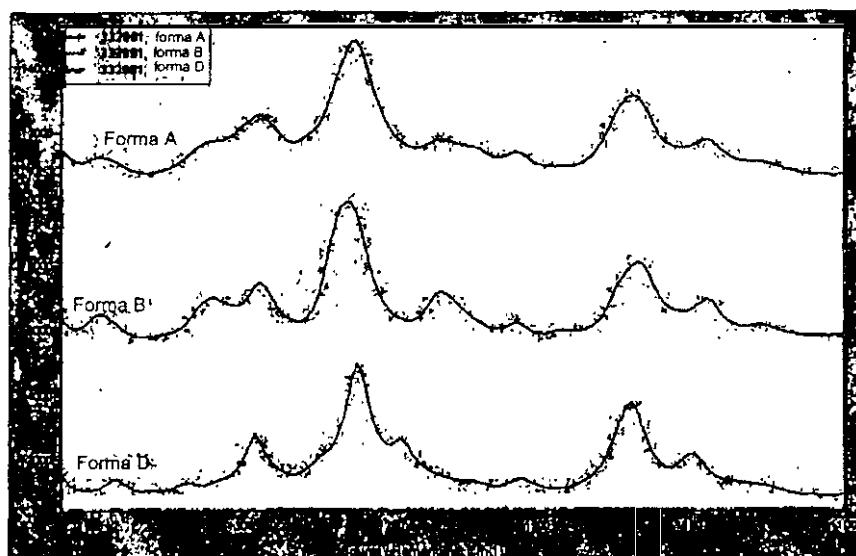


FIGURA 9

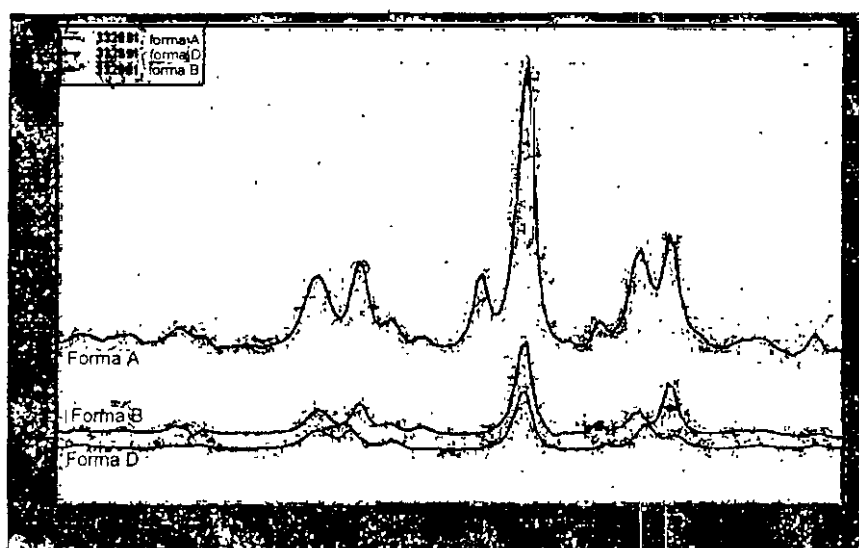


FIGURA 10

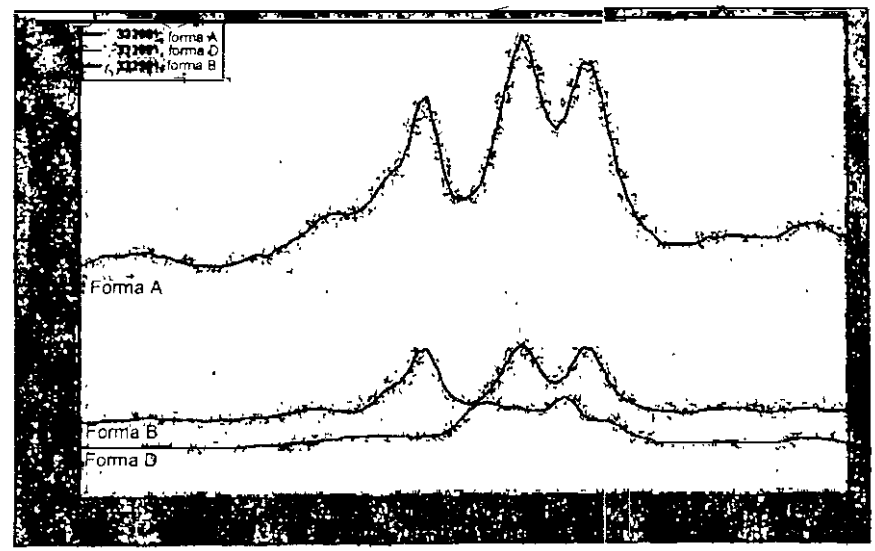


FIGURA 11

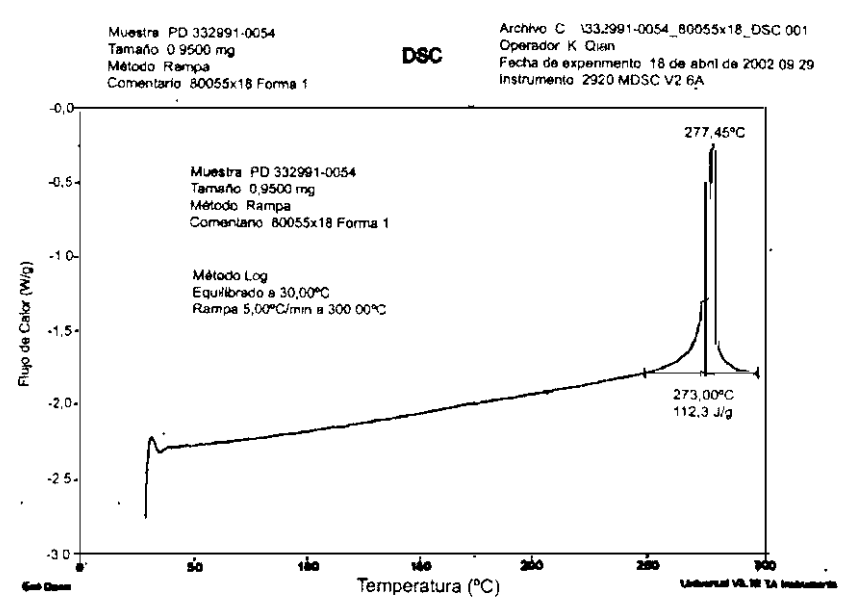


FIGURA 12

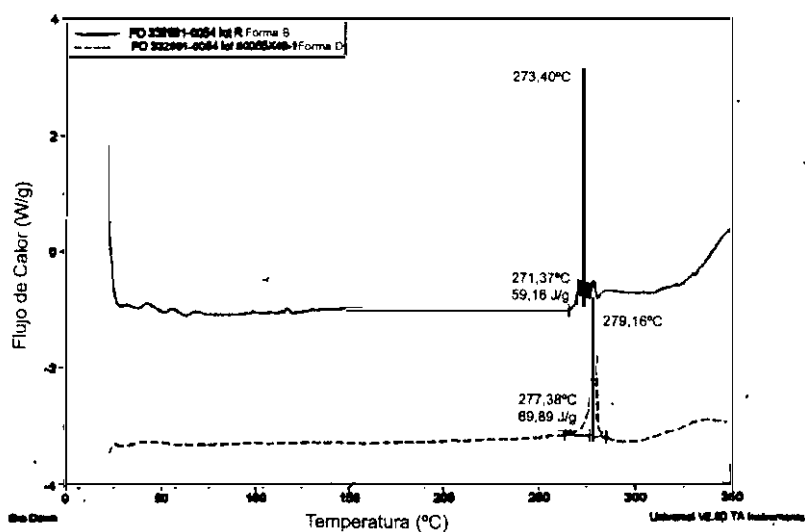


FIGURA 13

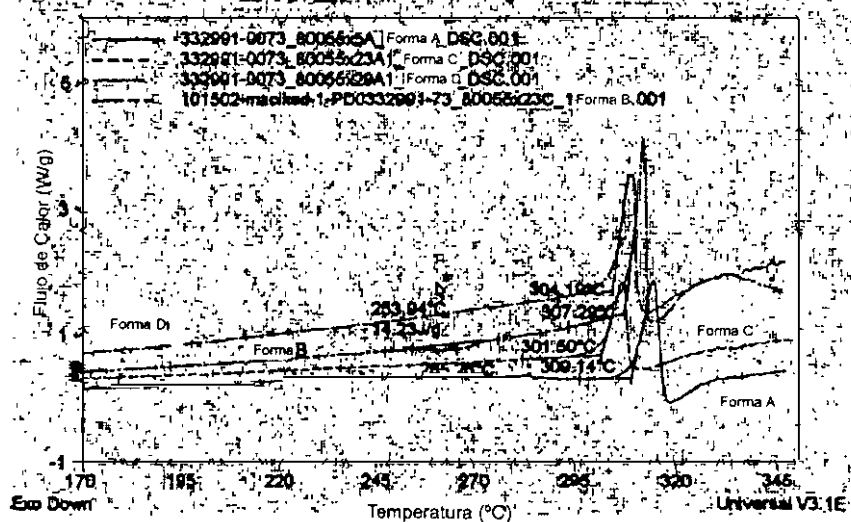


FIGURA 14

Muestra PD 332991 Di-Mesitato
Tamaño 2.2500 mg
Método Rampa
Comentario Darius

DSC

Archivo C:\332991_Di-Mesitato_Darius_USA.PJ1
Operador K.Qian
Fecha de experimento 5 de febrero de 2007
Instrumento 2970 DSC V2.6A

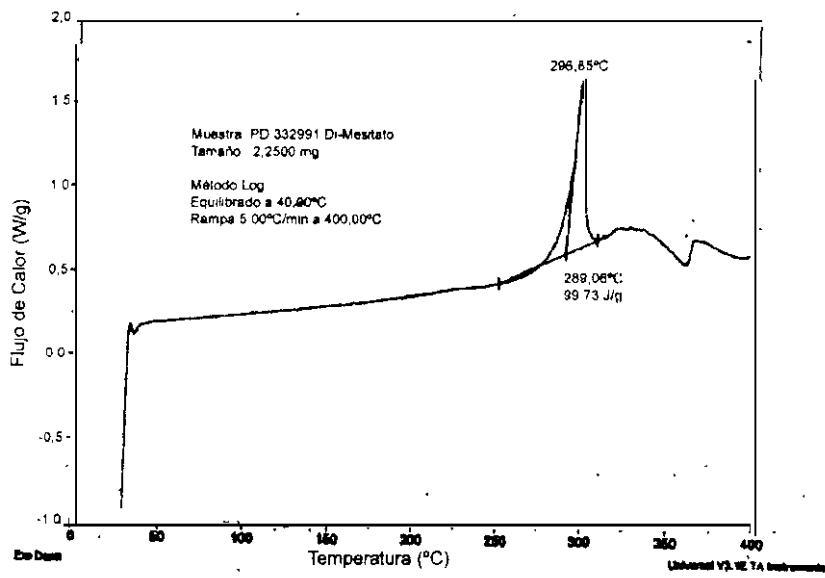


FIGURA 15

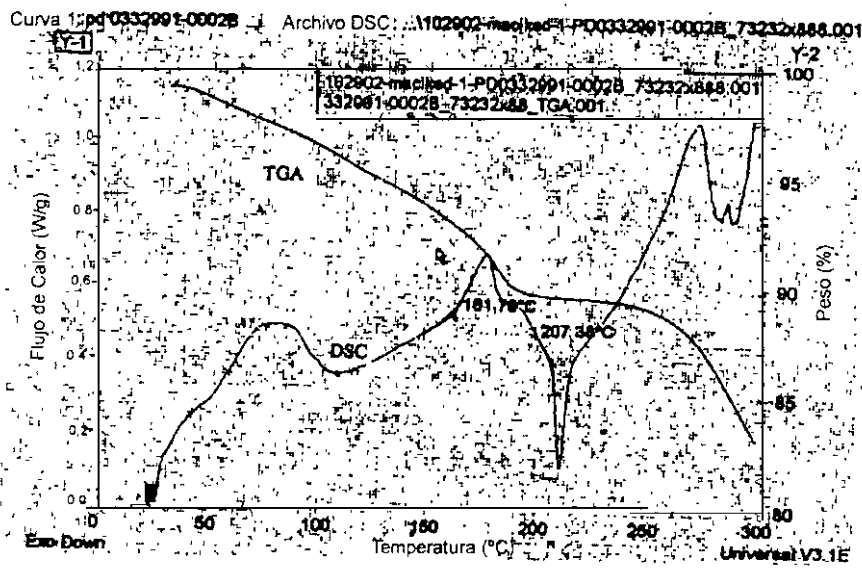


FIGURA 16

95 *94*

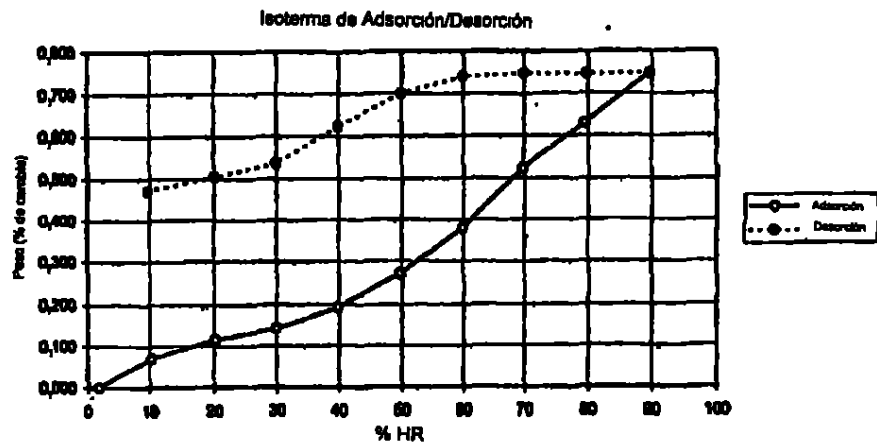


FIGURA 17

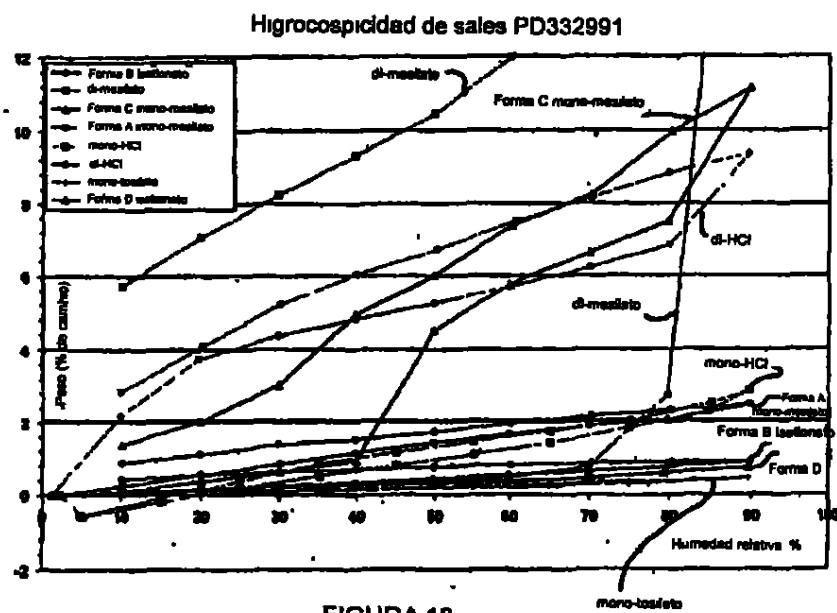


FIGURA 18

Certificación

Esther González García, Intérprete Jurada de Inglés,
certifica que la que antecede es traducción fiel y completa
al español de un documento redactado en Inglés.

En Madrid, a 20 de junio de 2004.

Esther González García
a/c Elzaburu S A
Miguel Angel, 21 28010 Madrid
Tel. 91 700 9400 Fax 91 319 3810
Intérprete Jurado del idioma inglés

[Handwritten signature]

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

RECEIVED

PCT JUN 18 2005

MOBS IP GBL SRVS

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

To:

FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing
(day/month/year)

07.08.2005

Applicant's or agent's file reference
PC25317A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No
PCT/IB2004/002152International filing date (day/month/year)
28.06.2004Priority date (day/month/year)
11.07.2003

Applicant

WARNER-LAMBERT COMPANY LLC et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authorityEuropean Patent Office
D-80288 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx. 523658 epmu d
Fax +49 89 2399 - 4485

Authorized Officer

Pitzner, G

Tel +49 89 2399-8032



PATENT COOPERATION TREATY

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 PC25317A	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA416	
International application No. PCT/IB2004/002152	International filing date (day/month/year) 28.06.2004	Priority date (day/month/year) 11.07.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07C303.00, C07D471.04		
Applicant WARNER-LAMBERT COMPANY LLC 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 36. 2. This REPORT consists of a total of (5) 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 70.13 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 802 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 19.07.2004	Date of completion of this report 07.06.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority.  European Patent Office D-80590 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4466	Authorized Officer Telephone No +49 89 2399- 8323 Cooper 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/IB2004/002152**Box No. I Basis of the report**

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report).*

Description, Pages

1-26 as originally filed

Claims, Numbers

1-21 as originally filed

Drawings, Sheets

1/10-10/10 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/IB2004/02152**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. 16-21

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 16-21 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

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No.
PCT/IB2004/002152

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	1-21
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-21
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made.

see separate sheet

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

International application No.

PCT/IB2004/002152

Section III.

- 1). For the assessment of the present claims 16-21 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
- 2). Claims 15-21 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).

Section V.

- 1). No compounds having the structure of that according to claim 1 could be found. All claims are novel.
- 2). The claimed compounds are inhibitors of CDK4 and as such of interest in treating inflammation and cell proliferative diseases. The present compounds, which are isethionate salts of a specified free base, have furthermore been shown to be more soluble in water than the free base, be less hygroscopic than the dihydrochloride of the same free base and to have more favourable crystalline properties than the monohydrochloride of the same free base. This information could not be deduced from the located prior art including the document cited in the search report.

Section VIII.

The forms A,B and D of claims 2 to 4 should be clearly identified by adding the information from the first three full paragraphs on p.4 of the description to the corresponding claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB2004/002152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D471/04 A61K31/519 A61P31/12 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPD-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 03/062236 A (BOOTH RICHARD JOHN ; BARVIAN MARK ROBERT (US); SHEEHAN DEREK JAMES (US) 31 July 2003 (2003-07-31) claims 1,10-15; example 36; table 1	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or history underlying the invention

T document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

T document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2004

Date of mailing of the international search report

15/09/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6818 Paludizaa 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cooper, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2004/002152

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 16-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

104
103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB2004/002152

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03062236 A	31-07-2003	WO 03062236 A1 US 2003149001 A1	31-07-2003 07-08-2003

105

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO	
Radicación : 06001246 00000000	Folios: 183
Fecha (AMD): 2006-01-06 15:08:43	
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC	
Dependencia: 2026 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN	()	()
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 presenta la solicitud.	()	()
Representación gráfica o 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 solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

[Firma]
Enero 06 de 2005

105
106

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de"
WARNER LAMBERT COMPANY LLC

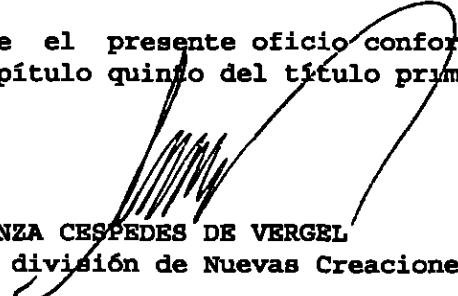
REFERENCIA	Radicación No.	6 1246
	Solicitud internacional	IB2004/002152
	Fecha inicio fase nacional	11/01/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2135

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 24 FEB. 2006
jramos