

COMPUESTOS DE AMINOPIRIDILOXIPIRAZOL

La presente invención se refiere a compuestos novedosos de aminopiridiloxipirazol que inhiben la actividad del receptor 1 del factor del crecimiento transformante beta(TGF β R1), composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y métodos para utilizar los compuestos para tratar cáncer, preferentemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer gástrico y/o fibrosis, preferentemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.

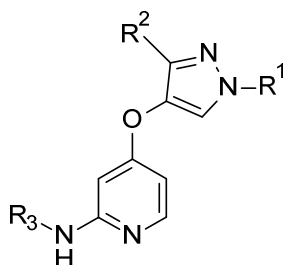
El factor del crecimiento transformante beta (TGF-beta o TGF β) es una citocina multifuncional que se une a los complejos heteroméricos de los receptores de la serina/treonina cinasa de tipo I y tipo II del TGF-beta y activa el complejo receptor del TGF-beta el cual se fosforila y activa a las SMAD2 y SMAD3, las cuales luego se asocian con la SMAD4 y migran al núcleo y regulan la expresión de distintos genes diana. Actores clave de la senda de la señal de transducción del receptor del TGF-beta incluyen TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, TGF β R1, TGF β R2, SMAD, SnoN, SARA, SKI, DAB, TRAP, TAK1, SMIF, E2F4, E2F5, RBL1, RBL2, RB1, TFDP1, TFDP2, SMURF1, SMURF2, P300, CBP y JUN. La senda del receptor del

TGF-beta mediada por la SMAD regula varios procesos celulares y fisiológicos tales como proliferación, diferenciación, crecimiento, migración, mielinización, detención del ciclo celular, apoptosis y desarrollo.

5 En la técnica ya se conocen inhibidores de moléculas pequeñas del TGFβR1 para el tratamiento de cáncer y/o fibrosis. Véanse por ejemplo WO2012/002680, WO2009/022171, WO2004/048382, y WO2002/094833. Desafortunadamente, no se conocen tratamientos curativos para muchos tipos de cáncer o
10 fibrosis. Sería deseable tener más inhibidores de moléculas pequeñas del TGFβR1 para tratar el cáncer, preferentemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer
15 gástrico, y/o fibrosis, preferentemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.

En particular, compuestos que son más selectivos para el TGFβR1.

La presente invención proporciona un compuesto de la
20 fórmula:



en el cual:

R¹ es hidrógeno, isopropilo, difluorometilo, difluoroetilo o cicropopilo;

R² es etilo, terc-butilo, piridin-2-ilo, 5 tetrahidropiran-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, ciclopropilo, o ciclobutilo; y

R³ es carbamoilfenilo, piridin-2-ilo, (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo, 1-metil-2-oxo-1H-piridin-4-ilo, 1-metilpirazolilo, pirazin-2-ilo, 2-metoxipirimidin-4-ilo, 1-10 metil-2-oxo-1H-pirimidin-4-ilo, piridazin-3-ilo, 6-cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo o 6-metoxipiridazin-3-ilo;

o una sal de ellos aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

15 La presente invención también proporciona 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

La presente invención también proporciona 4-20 metilbencenosulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol.

La presente invención también proporciona 4-metilbencenosulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-

(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol cristalino. La presente invención además proporciona 4-metlbencenosulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol cristalino caracterizado mediante el patrón de difracción de polvo de rayos X (radiación Cu, $\lambda=1,54060 \text{ \AA}$) que comprende un pico a $17,8^\circ$ con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste en $19,7^\circ$, $18,4^\circ$ y $22,0^\circ (2\theta \pm 0,2^\circ)$.

La presente invención también proporciona un método para tratar el cáncer, preferentemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer gástrico, en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende administrarle al paciente una cantidad eficaz de un compuesto o sal de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para tratar la fibrosis, preferentemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica, en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende administrarle al paciente una cantidad eficaz de un compuesto o sal de la presente invención.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de la presente invención y uno o más excipientes, portadores o diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

5 La presente invención también proporciona un compuesto o sal de la presente invención para su uso en terapia. De manera adicional, la presente invención proporciona un compuesto o sal de la presente invención para utilizarlo en el tratamiento de cáncer, preferentemente cáncer de colon,
10 melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón y cáncer gástrico y/o fibrosis, preferentemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica. Además, la presente invención proporciona el
15 uso de un compuesto o sal de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer, preferentemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer renal, glioblastoma (GBM), cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer de pulmón
20 y cáncer gástrico y/o fibrosis, preferentemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.

Los siguientes párrafos describen clases preferidas de la presente invención:

a) R^1 es difluorometilo, difluoroetilo, o ciclopropilo;

b) R^2 es piridin-2-ilo, tetrahidropiran-4-ilo, o ciclopropilo;

c) R^3 es carbamoilfenilo o (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo;

5 d) R^1 es ciclopropilo y R^2 es tetrahidropiran-4-ilo;

e) R^1 es ciclopropilo y R^2 es ciclopropilo;

f) R^1 es difluoroetilo y R^2 es tetrahidropiran-4-ilo;

g) R^1 es difluorometilo y R^2 es pirid-2-ilo;

h) R^1 es ciclopropilo, R^2 es tetrahidropiran-4-ilo, y R^3
10 es (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo;

i) R^1 es ciclopropilo, R^2 es ciclopropilo, y R^3 es (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo;

j) R^1 es difluoroetilo, R^2 es tetrahidropiran-4-ilo, y R^3
es (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo; y

15 k) R^1 es difluorometilo, R^2 es piridin-2-ilo, y R^3 es carbamoilfenilo.

El lector experto en la técnica entenderá que las formas de base libre de los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales y dichas sales se encuentran
20 contempladas como parte de la presente invención. Los compuestos de base libre de la presente invención son aminas, y por consiguiente reaccionan con cualquiera de una cantidad de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido aceptables desde el punto de vista

farmacéutico. Dichas sales de adición de ácido aceptables desde el punto de vista farmacéutico y la metodología común para prepararlas son conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, P. Stahl, et ál., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL
5 SALTS:PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008); S.M. Berge, et ál., "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Tomo 66, n.º 1, enero 1977. El experto en la técnica entenderá que la estequiometría de la sal puede determinarse fácilmente. Véase por ejemplo, D.
10 Risley, et ál., Simultaneous Determination of Positive and Negative Counterions Using a Hydrophilic Interaction Chromatography Method, *LCGC NORTH AMERICA*, Tomo 24, n.º 8, agosto 2006, páginas 776-785.

Determinados compuestos de la presente invención son
15 cristalinos. En la técnica de la cristalografía se sabe que, para cualquier forma cristalina, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y hábitos cristalinos. Donde se encuentran
20 presentes los efectos de la orientación preferida, se alteran las intensidades pico, pero las posiciones pico características del polimorfo no se cambian. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también es

sabido en la técnica de la cristalografía que para cualquier forma cristalina las posiciones pico angulares pueden variar levemente. Por ejemplo, las posiciones pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la cual se analiza la muestra, desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En los presentes casos, una variabilidad de posición pico de $\pm 0,2$ en 2θ tomará en cuenta estas variaciones potenciales sin dificultar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada.

La confirmación de una forma cristalina puede realizarse mediante cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de $^{\circ} 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de la forma cristalina, recolectados a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustan según los picos estándar NIST 675 a 8,853 y 26,774 grados 2-theta.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con los siguientes esquemas sintéticos mediante métodos conocidos y apreciados en la técnica. Las condiciones de reacción adecuadas para los pasos de estos esquemas son conocidas en la técnica y las sustituciones apropiadas de solventes y correactivos se encuentran dentro de la técnica. Asimismo, los expertos en la técnica podrán apreciar que los intermedios sintéticos pueden aislarse y/o purificarse mediante diversas técnicas conocidas según se

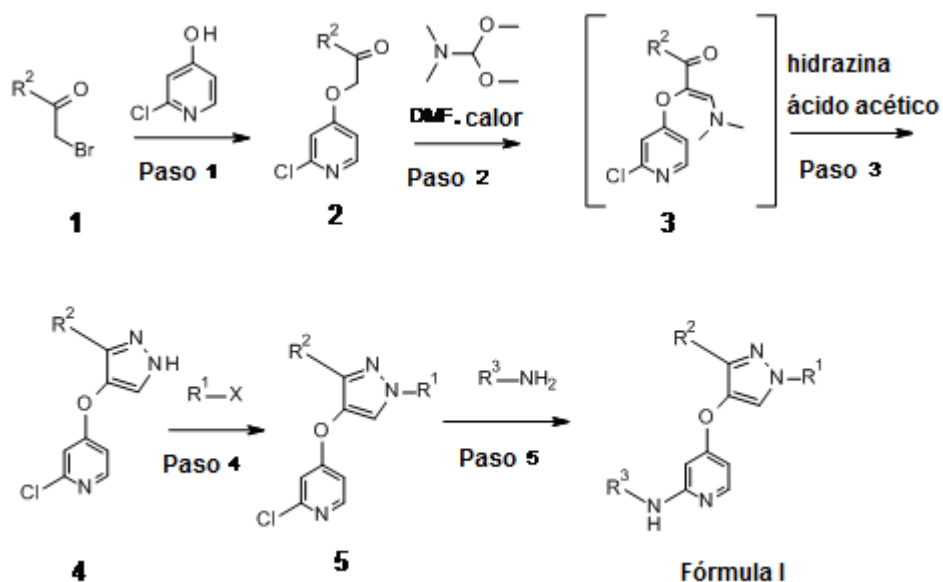
necesite o desee y que frecuentemente será posible utilizar
varios intermedios directamente en pasos sintéticos
posteriores con poca purificación o sin purificación. Además,
el experto en la técnica apreciará que en algunas
5 circunstancias el orden en el cual se introducen porciones no
es crucial. El orden particular de los pasos requeridos para
producir los compuestos de la presente invención depende del
compuesto en particular a sintetizar, el compuesto de partida
y la responsabilidad relativa de las porciones sustituidas,
10 como lo podrá apreciar un experto en química. Todos los
sustituyentes son los que se definieron anteriormente, a
menos que se indique lo contrario, y todos los reactivos son
conocidos y apreciados en la técnica.

Algunos intermedios de compuestos de la presente
15 invención pueden tener uno o más centros quirales. La
presente invención contempla todos los enantiómeros y
diastereómeros individuales, así como mezclas de los
enantiómeros y diastereómeros de dichos compuestos lo que
incluye racematos. Se prefiere que los compuestos de la
20 presente invención que contienen al menos un centro quiral
existan como enantiómeros y diastereómeros simples. Los
enantiómeros o diastereómeros simples pueden prepararse a
partir de reactivos quirales o mediante técnicas sintéticas
estereoselectivas o estereoespecíficas. De manera

alternativa, los enantiómeros o diastereómeros simples pueden aislarse de mezclas mediante técnicas de cristalización o cromatografía quiral. El experto en la técnica apreciará que en algunas circunstancias el orden de elución de los
5 enantiómeros o diastereómeros puede ser diferente debido a diferentes fases móviles y columnas cromatográficas.

La denominación "isómero 1" en el nombre de un compuesto significa que el intermedio o compuesto correspondiente de la presente invención es el primero de dos enantiómeros
10 eluyentes cuando se separa una mezcla de un par de enantiómeros mediante cromatografía quiral. La denominación "isómero 2" en el nombre de un compuesto representa que el intermedio o compuesto correspondiente de la presente invención es el segundo de dos enantiómeros eluyentes cuando
15 se separa la mezcla de un par de enantiómeros mediante cromatografía quiral.

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

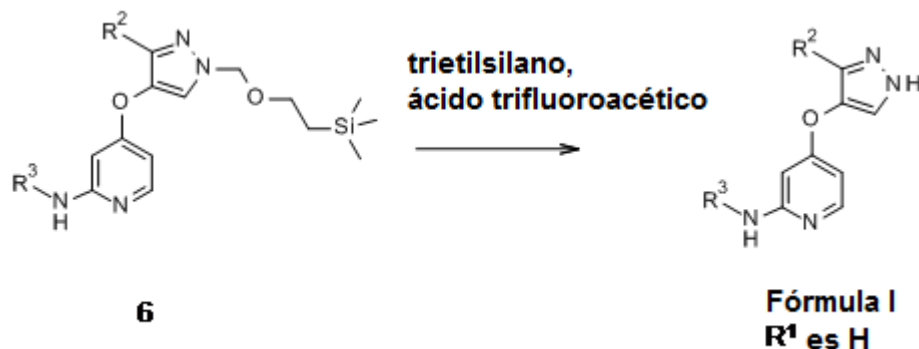


Esquema 1: Síntesis de compuestos de la Fórmula I

El Esquema 1 ilustra la síntesis general de los compuestos de la Fórmula I. El Compuesto 1 se hace reaccionar con 2-cloropiridin-4-ol en un solvente adecuado tal como dimetilformamida (DMF) o acetona con una base adecuada tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio a temperatura ambiente o temperatura elevada para proporcionar el Compuesto 2. El Compuesto 2 se hace reaccionar con 1,1-dimetoxi-N,N-dimetil-metianamina a temperatura elevada para formar el Compuesto 3. El Compuesto 3 puede purificarse o utilizarse sin purificación adicional para que reaccione con hidrazina en ácido acético para proporcionar el Compuesto 4. El Compuesto 4 puede reaccionar con un reactivo de alquilación adecuado tal como alquiltrifluoroborato de potasio o ácido alquibórico en condiciones de acoplamiento Chan-Lam para

formar el Compuesto 5. Más específicamente, primero se calienta una suspensión de 2,2'-bipiridina y acetato de cobre(II) en un solvente adecuado tal como 1,2-dicloroetano a temperatura elevada y se purga con nitrógeno y luego se
5 filtra la mezcla de reacción y se agrega el filtrado a una mezcla del Compuesto 4, un boronato adecuado tal como alquiltrifluoroborato de potasio o un ácido alquibórico, y una base adecuada tal como carbonato de sodio en un solvente adecuado tal como 1,2-dicloroetano. Se calienta la mezcla de
10 reacción hasta llegar a una temperatura adecuada para proporcionar el Compuesto 5. El Compuesto 4 también puede reaccionar con un haloalcano adecuado tal como yoduro de alquilo, bromuro de alquilo o cloruro de alquilo con una base adecuada tal como un hidruro de sodio en un solvente adecuado
15 tal como DMF o tetrahidrofurano (THF) para proporcionar el Compuesto 5. El Compuesto 5 se hace reaccionar con una amina adecuada bajo condiciones de acoplamiento Buchwald conocidas para proporcionar un compuesto de la Fórmula I. Más específicamente, el Compuesto 5 se hace reaccionar con una
20 amina adecuada a temperatura elevada en presencia de una base adecuada tal como carbonato de cesio, un reactivo ligando adecuado tal como 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno y un catalizador adecuado tal como acetato de paladio (II) en

un solvente apropiado tal como 1,4-dioxano para proporcionar un compuesto de la Fórmula I.

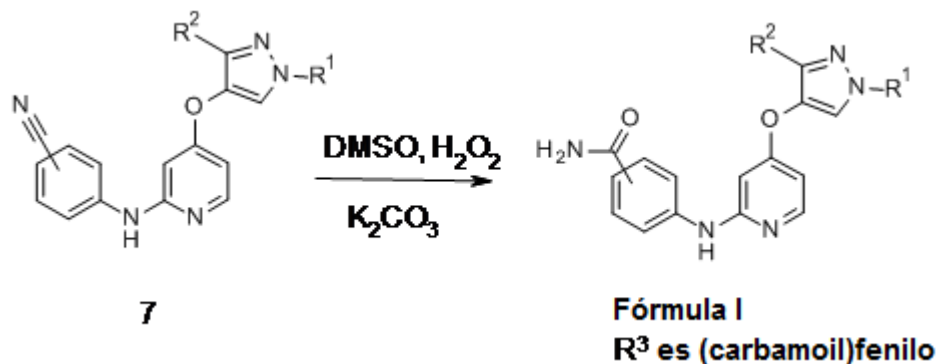


Esquema 2: Síntesis de compuestos de la Fórmula I cuando

5

R¹ es H

El Esquema 2 ilustra la síntesis general de los compuestos de la Fórmula I cuando R¹ es H. Como se ilustra en el Paso 4 del Esquema 1, cuando el reactivo de alquilación es cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetilo, el Compuesto 6 se puede obtener mediante alquilación mediante el Paso 4 y reacción de acoplamiento Buchwald mediante el Paso 5. El Compuesto 6 puede reaccionar con trietilsilano en ácido trifluoroacético para proporcionar un compuesto de la Fórmula I en la cual R¹ es H. Cuando R¹ es H, el experto en la técnica sabrá que un compuesto de la Fórmula I puede existir como un par de tautómeros en los cuales el hidrógeno puede migrar entre dos nitrógenos en el anillo de pirazolilo.



Esquema 3: Síntesis de compuestos de la Fórmula I cuando R³ es (carbamoyl)fenilo

El Esquema 3 ilustra la síntesis general de los compuestos de la Fórmula I cuando R³ es un grupo (carbamoyl)fenilo. El Compuesto 7 puede realizarse mediante el método ilustrado en el Paso 5 del Esquema 1 cuando R³ es un benzonitrilo sustituido apropiadamente. El Compuesto 7 se hace reaccionar con peróxido de hidrógeno y una base adecuada tal como carbonato de potasio en dimetilsulfóxido (DMSO) para proporcionar un compuesto de la Fórmula I cuando R³ es un grupo (carbamoyl)fenilo.

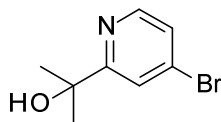
Tal como se utilizan en la presente, los siguientes términos tienen los significados indicados: "ACN" se refiere a acetonitrilo; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "DCM" se refiere a diclorometano; "DMF" representa a N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "DTT" se refiere a ditiotreitól; "EDTA" se refiere a ácido etilenediaminetetraacético; "EGTA" se refiere a ácido

tetraácetico de etilenglicol; "ELISA" se refiere a un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "FBS" se refiere a suero fetal bovino ; "HEC" se refiere a hidroxietilcelulosa; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "IVTI" se refiere a inhibición de diana in vivo; "MS" se refiere a espectroscopía de masa; "MeOH" se refiere a metanol; "NMR" se refiere a resonancia magnética nuclear; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "TBS" se refiere a solución salina tamponada con tris; "TED" se refiere a dosis eficaz para el umbral; "UVW" se refiere a longitud de onda ultravioleta y "XRD" se refiere a difracción de rayos X.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos que se ilustran en la presente se nombran y numeran utilizando ACDLABS o Accelrys Draw 4.1.

Preparación 1

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



20

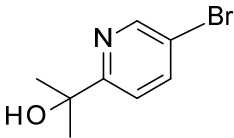
Se prepara un matraz de base redonda de tres litros y tres bocas con un embudo de adición, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una sonda de temperatura.

Se carga con bromuro de metilmagnesio (3,2 M en 2-metiltetrahidrofuran, 239,07 mL, 765,01 mmol) y se enfría en un baño de hielo. Al embudo de adición se le agrega una solución de 4-bromopiridine-2-carboxilato de etilo (80,0 g, 347,73 mmol) en THF (800,0 mL). Se agrega la solución gota a gota a la solución de bromuro de metilmagnesio mientras que se mantiene la temperatura interna en menos de 25 °C. Se retira el baño de enfriamiento y se permite que se agite a 25 °C durante 30 minutos. Se enfría la mezcla de reacción hasta 5 °C y se inactiva cuidadosamente con la adición gota a gota de una solución de ácido clorhídrico acuosa (1 M) mientras que se mantiene la temperatura interna a menos de 30 °C. Se agrega solución de ácido clorhídrico adicional (1 M) hasta que la mezcla llegue a un pH de alrededor de 7. Se quita el baño de enfriamiento y se diluye con acetato de etilo (EtOAc; 200 mL). Se aísla la capa orgánica, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra a través de un tapón de CELITE® y se enjuaga con EtOAc. Se concentra el filtrado para proporcionar un aceite anaranjado. Se purifica utilizando un tapón de gel de sílice eluyendo con hexano/EtOAc (3/1) para proporcionar el compuesto del título (63,15 g; 84,0 % de rendimiento) como un aceite incoloro. MS (m/z): 216/218 (M+1/M+3).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente a través del método de la Preparación 1.

Tabla 1:

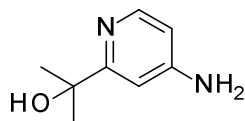
5

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

10

Preparación 3

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



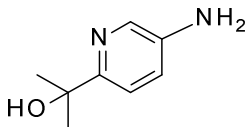
Se carga un reactor Parr de dos litros con una barra
 15 agitadora, cobre (tamiz de polvo, 12,6 g, 198,6 mmol), 2-(4-bromo-2-piridil)propan-2-ol (63,1 g, 292,0 mmol) e hidróxido de amoníaco (28 % peso/peso en agua, 757,2 mL). Se agita la mezcla de reacción al aire libre durante 30 minutos hasta que se torna azul oscuro. Se quita la barra agitadora, se conecta
 20 a una cubierta agitadora mecánica se sella y se coloca en un agitador. Se calienta la mezcla hasta 100 °C (interno, baño de calentamiento a 120 °C) y se agita durante la noche. Se enfría la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se

agrega 2-metiltetrahidrofuran (600 mL). Se filtra a través de un tapón de CELITE® y se enjuaga con 2-metiltetrahidrofurano. Se aísla la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con 2-metiltetrahidrofurano (200 mL). Se combinan las capas orgánicas y se secan sobre sulfato de sodio anhidro. Se filtra, se concentra y se seca al vacío durante la noche para proporcionar el compuesto del título (31,3 g; 70,4 % de rendimiento) como un aceite amarillo. MS (m/z): 153 (M+1).

El siguiente compuesto se prepara esencialmente mediante el método de la Preparación 3.

Tabla 2:

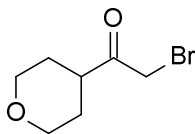
15

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

20

Preparación 5

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



Método 1:

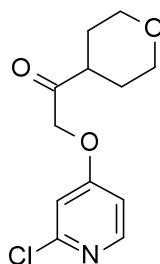
Se agrega cloruro de oxalilo (28,69 mL, 330,73 mmol) gota a gota a una mezcla de ácido tetrahidropiran-4-carboxílico (39,13 g, 300,67 mmol) en DCM (250 mL) y DMF (15 gotas). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 2,5
5 horas en nitrógeno. Se concentra a presión reducida y se disuelve el residuo en DCM (250 mL). La solución resultante se agrega gota a gota a (trimetilsilil)diazometano (2 M en hexanos, 450 mL, 900,00 mmol) a -10 °C y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se enfría
10 hasta 0 °C y se agrega ácido bromhídrico (48 % peso/peso en agua, 52 mL, 462,73 mmol) gota a gota. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla se enfría hasta 0 °C y se agrega ácido bromhídrico (48 % peso/peso en agua, 26 mL, 231,36 mmol) gota a gota. La mezcla se agita
15 temperatura ambiente durante dos horas. Se agrega agua (250 mL), DCM (250 mL) y se aísla la capa orgánica. Se extrae la capa acuosa con DCM (250 mL, 2 veces). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con una solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada y cloruro de sodio acuoso saturado. Se
20 seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (58,2 g; 93,48 % de rendimiento) como un sólido marrón. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

Método 2:

Se enfría una solución de 1-tetrahidropiran-4-iletanona (10 g, 78,02 mmol) en metanol (MeOH; 50 mL) hasta -10 °C. Se
 5 agrega bromo (4,01 mL, 78,02 mmol) gota a gota. Se agita la mezcla a 0 °C durante 45 minutos y luego a 10 °C durante 45 minutos. Se agrega una solución acuosa de ácido sulfúrico (11 M, 27,5 mL, 302,50 mmol) y se agita la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Se agrega agua y se
 10 extrae con dietiléter tres veces. Se combinan las capas orgánicas. Se lavan con una solución acuosa de bicarbonato de sodio y agua. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (12 g; 74,28 % de rendimiento) como un sólido
 15 blanco. ¹H NMR (400,13 MHz, CDCl₃) δ 4,00 (m, 2H), 3,95 (s, 2H), 3,45 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 1,78 (m, 4H).

Preparación 6

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

**Método 1:**

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

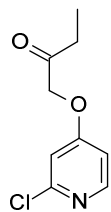
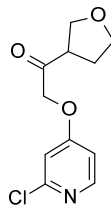
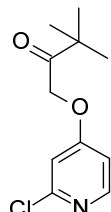
20 Método 2:

Se agrega 2-bromo-1-tetrahidropiran-4-il-etanona (10,03 g, 48,42 mmol) y carbonato de potasio (10,14 g, 72,62 mmol) a una solución de 2-cloropiridin-4-ol (6,40 g, 48,42 mmol) en acetona (150 mL) y la mezcla resultante se

agita a temperatura ambiente durante la noche. Se filtra para quitar el sólido y se lava el sólido con DCM. Se concentra el filtrado a presión reducida para proporcionar el compuesto del título de forma cuantitativa. MS (m/z): 256 (M+1).

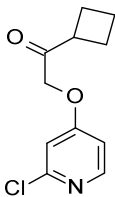
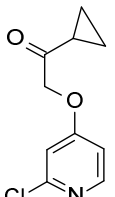
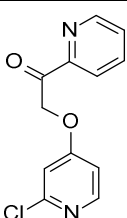
- 5 Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el **Método 2** de la Preparación 6.

Tabla 3:

10	Prep. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z) :
15	7	1-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]butan-2-ona		200 (M+1)
	8	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-tetrahidrofuran-3-il-etanona		242 (M+1)
20	9	1-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-3,3-dimetil-butan-2-ona		228 (M+1)

5

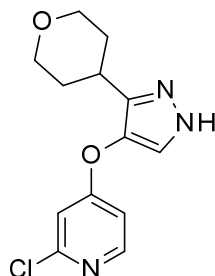
10

10	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-ciclobutil-etanona		226 (M+1)
11	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-ciclopropil-etanona		212 (M+1)
12	2-[(2-Cloro-4-piridil)oxi]-1-(2-piridil)etanona		249 (M+1)

Preparación 13

15

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



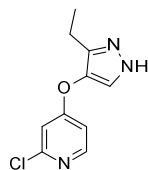
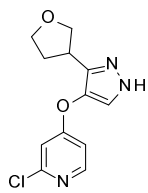
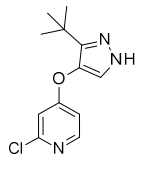
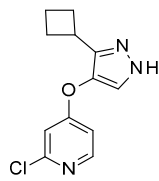
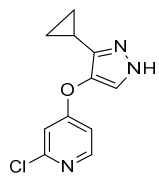
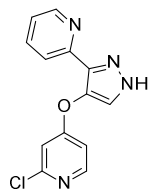
20

Se agita una mezcla de 2-[(2-cloro-4-piridil)oxi]-1-tetrahidropiran-4-il-etanona (29,3 g, 114,59 mmol) y 1,1-dimetoxi-N,N-dimetil-metanamina (65 mL, 486,83 mmol) a 100 °C durante dos horas. Se enfría a temperatura ambiente, se

concentra a presión reducida y se disuelve el residuo en EtOAc (400 mL). Se lava con agua (100 mL) y cloruro de sodio acuoso saturado (100 mL). Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a presión reducida para proporcionar un sólido marrón. Se disuelve en ácido acético (350 mL) y se enfría hasta 0 °C. Se agrega monohidrato de hidrazina (16,8 mL, 345,66 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante la noche en nitrógeno. Se vierte la mezcla en una mezcla de hielo y agua (250 mL) y se extrae con EtOAc (200 mL, 4 veces). Se combinan las capas orgánicas y se lavan con agua (200 mL), solución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (100 mL) y cloruro de sodio acuoso saturado (100 mL). Se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida para proporcionar un aceite marrón. Se purifica el aceite marrón utilizando un tapón de gel de sílice eluyendo con EtOAc. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentran a presión reducida. Se seca al vacío para proporcionar el compuesto del título (24,43 g; 76,22 % de rendimiento) como un sólido amarillo. MS (m/z): 280 (M+1).

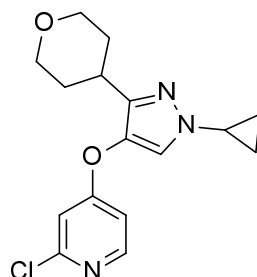
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el método de la Preparación 13.

Tabla 4:

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

Preparación 20

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



5 **Método 1:**

Se somete a reflujo una mezcla de 2,2'-bipiridina (13,73 g, 87,90 mmol) y acetato de cobre(II) (15,97 g, 87,90 mmol) en 1,2-dicloroetano (244,3 mL) a 75 °C durante 25 minutos y luego se enfría hasta temperatura ambiente. Se
 10 agrega una solución de 2-cloro-4-[(3-tetrahidropiran-4-il-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina (24,43 g, 79,91 mmol) en 1,2-dicloroetano (335,30 mL), luego se agrega ácido ciclopropilborónico (13,73 g, 159,82 mmol) y carbonato de sodio (16,94 g, 159,82 mmol). Se calienta la mezcla de
 15 reacción a 75 °C durante dos horas en una atmósfera de oxígeno y se enfría hasta temperatura ambiente. Se diluye con EtOAc (200 mL), se filtra a través de un tapón de gel de sílice y se enjuaga con EtOAc (250 mL). Se lava el filtrado con agua (200 mL) y cloruro de sodio acuoso saturado
 20 (200 mL). Se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida y se seca el

residuo al vacío a temperatura ambiente durante la noche. Se purifica mediante cromatografía de columna de gel de sílice con EtOAc al 6 a 27 % en DCM para proporcionar el compuesto del título (20,75 g; 81,2 % de rendimiento) como un sólido
 5 amarillo. MS (m/z): 320 (M+1).

Método 2:

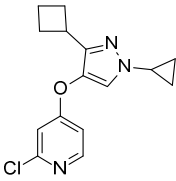
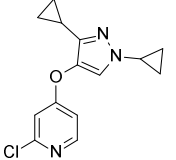
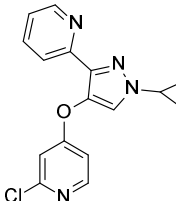
Se calienta una suspensión de 2,2'-bipiridina (28,8 g, 56,5 mmol) y acetato de cobre(II) (8,2 g, 45,2 mmol) en 1,2-
 10 dicloroetano (50 mL) a 70 °C y se purga con nitrógeno durante 3 minutos. Se filtra y se agrega el filtrado a una mezcla de 2-cloro-4-[(3-tetrahidropiran-4-il-1H-pirazol-4-il)oxi]piridina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

(m/z): 320 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el **Método 1** de la Preparación 20.

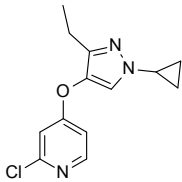
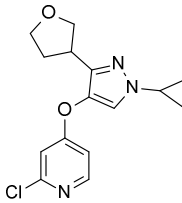
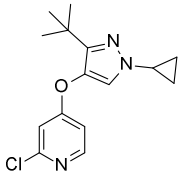
Se indican las alteraciones en el procedimiento de
5 tratamiento.

Tabla 5:

Prep. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z) :	Comentarios
10 21	2-Cloro-4-(3-ciclobutil-1-ciclopropil-pirazol-4-il)oxi-piridina		290 (M+1)	
15 22	2-Cloro-4-(1,3-diciclopropilpirazol-4-il)oxi-piridina		276 (M+1)	
20 23	2-Cloro-4-[1-ciclopropil-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina		313 (M+1)	Se utiliza hidróxido de amoníaco al 23 % en agua para inactivar la reacción.

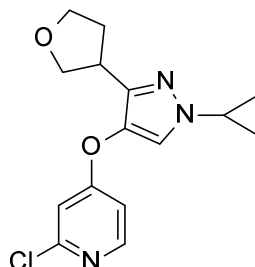
Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el **Método 2** de la Preparación 20.

Tabla 6:

5	Prep. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z) :
10	24	2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-etil-pirazol-4-il)oxi-piridina		264 (M+1)
15	25	2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina		306 (M+1)
20	26	4-(3-Terc-butil-1-ciclopropil-pirazol-4-il)oxi-2-cloro-piridina		292 (M+1)

Preparación 27

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

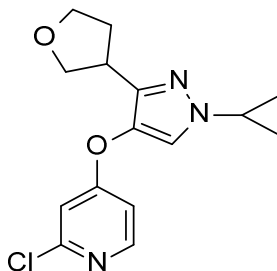


5 Se purifica la mezcla racémica de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (**Preparación 25**) con cromatografía quiral para proporcionar el primer enantiómero eluyente como el compuesto del título. MS (m/z): 306 (M+1).

10 Condición de purificación: CHIRALPAK® IC; fase móvil: etanol al 20 % (EtOH) en dióxido de carbono; tasa de flujo: 300 g/min; UVW: 240 nm; Tiempo de retención: 2,44 minutos.

Preparación 28

15 2-Cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina, isómero 2



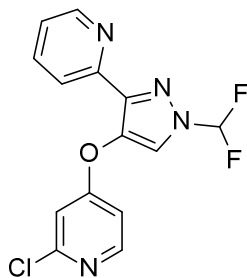
Se purifica la mezcla racémica de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (**Preparación 25**) con cromatografía quiral para proporcionar el segundo enantiómero eluyente como el compuesto del título.

5 MS (m/z): 306 (M+1).

Condición de purificación: CHIRALPAK® IC; fase móvil: EtOH al 20 % en dióxido de carbono; tasa de flujo: 300 g/minuto; UVW: 240 nm; tiempo de retención: 2,93 minutos.

Preparación 29

10 2-Cloro-4-[1-(difluorometil)-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina



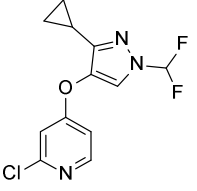
Se enfría una solución de 2-cloro-4-[[3-(2-piridil)-1H-
 15 pirazol-4-il]oxi]piridina (2,0 g, 7,33 mmol) en DMF (73,34 mL) en un baño de hielo y se agrega hidruro de sodio (60 % en aceite mineral, 880,02 mg, 22,00 mmol) en porciones. Se agita la mezcla a 0 °C durante 10 minutos, se deja calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante 10
 20 minutos. Se agrega difluoroyodometano (10 % en peso en THF, 27,19 mL, 36,67 mmol) y se agita la mezcla de reacción a

45 °C durante la noche. Se enfría a temperatura ambiente y se diluye con EtOAc. Se lava primero con solución de cloruro de litio acuosa al 5 % y luego se lava con cloruro de sodio acuoso saturado. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el residuo mediante cromatografía de columna en gel de sílice con EtOAc al 0 a 50 % en DCM. Se combinan las fracciones apropiadas y se concentran a presión reducida. Se purifica el residuo mediante cromatografía de columna en gel de sílice con EtOAc al 0 a 10 % en DCM para proporcionara el compuesto del título (1,56 g; 65,9 % de rendimiento). MS (m/z): 323 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el método de la Preparación 29.

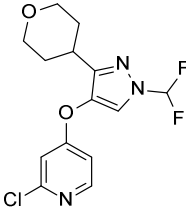
Se indican las alteraciones al solvente, base, y/o temperatura de reacción.

Tabla 7:

Prep. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos	Comentarios
30	2-Cloro-4-[3-ciclopropil-1-(difluorometil)pirazol-4-il]oxipiridina		MS (m/z): 286 (M+1)	THF, terc-butóxido de potasio

5

10

31	2-Cloro-4-[1-(difluorometil)-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il]oxi-piridina		¹ H NMR (399,83 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 8,42 (s, 1H), 8,30 (d, J=5,6 Hz, 1H), 7,71 (t, J=59,2 Hz, 1H), 7,15 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,04 (dd, J=2,4 Hz, J=5,6 Hz, 1H), 3,81 (m, 2H), 3,33 (m, 2H), 2,80 (m, 1H), 1,64 (m, 4H).	
----	---	---	---	--

15

5

10

15

20

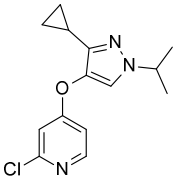
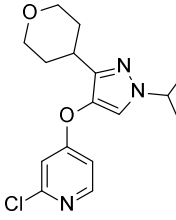
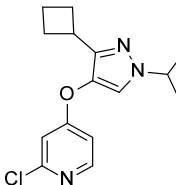
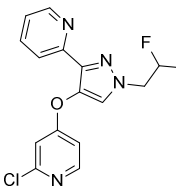
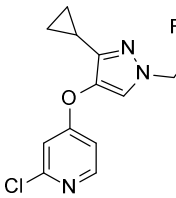
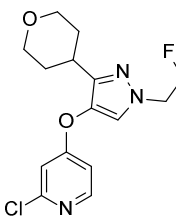
32	2-Cloro-4-[1-(difluorometil)-3-tetrahidrofuran-3-il]oxi-piridina		^1H NMR (399,83 MHz, DMSO- d_6) δ 8,46 (s, 1H), 8,30 (d, $J=5,6$ Hz, 1H), 7,71 (t, $J=59,2$ Hz, 1H), 7,16 (d, $J=2,4$ Hz, 1H), 7,05 (dd, $J=2,4$ Hz, $J=5,6$ Hz, 1H), 3,89 (t, $J=6,0$ Hz, 1H), 3,68 (m, 3H), 3,26 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,99 (m, 1H).	
33	2-Cloro-4-[3-ciclobutil-1-(difluorometil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 300 (M+1)	
34	2-Cloro-4-[1-isopropil-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 315 (M+1)	THF, terc-butóxido de potasio, a reflujo durante la noche

5

10

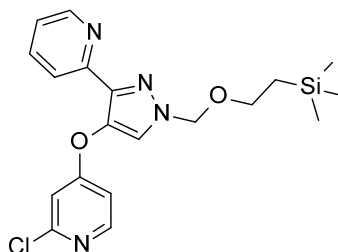
15

20

35	2-Cloro-4-(3-ciclopropil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-piridina		MS (m/z): 278 (M+1)	temperatura ambiente
36	2-Cloro-4-(1-isopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina		MS (m/z): 322 (M+1)	temperatura ambiente
37	2-Cloro-4-(3-ciclobutil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-piridina		MS (m/z): 292 (M+1)	temperatura ambiente
38	2-Cloro-4-[1-(2,2-difluoroetil)-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 337 (M+1)	THF, terc-butóxido de potasio, 50 °C
39	2-Cloro-4-[3-ciclopropil-1-(2,2-difluoroetil)pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 300 (M+1)	Carbonato de cesio, 50 °C
40	2-Cloro-4-[1-(2,2-difluoroetil)-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il]oxi-piridina		MS (m/z): 344 (M+1)	Carbonato de cesio, 50 °C

Preparación 41

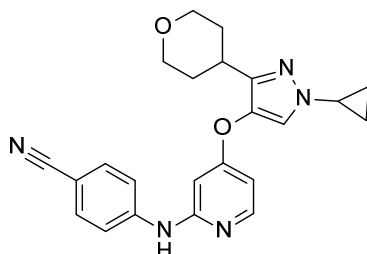
2-Cloro-4-{[3-(piridin-2-il)-1-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirazol-4-il]oxi}piridina



- 5 Se agrega hidruro de sodio (suspensión al 60 % en aceite mineral, 484 mg, 12,10 mmol) a una solución de 2-cloro-4-[[3-(2-piridil)-1H-pirazol-4-il]oxi]piridina (3,0 g, 11,00 mmol) en THF (110 mL) a 0 °C. Se agita durante 15 minutos a 0 °C y se agrega cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetilo (2,02 g,
- 10 12,10 mmol). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se concentra la mezcla. Se divide el residuo entre DCM y agua. Se aísla la capa orgánica y se seca sobre sulfato de sodio. Se filtra la mezcla y se concentra el filtrado a presión reducida. Se purifica el
- 15 residuo mediante cromatografía de columna en gel de sílice con EtOAc al 0 a 30 % en hexano para proporcionar el compuesto del título (3,64 g; 82,1 % de rendimiento). MS (m/z): 403 (M+1).

Preparación 42

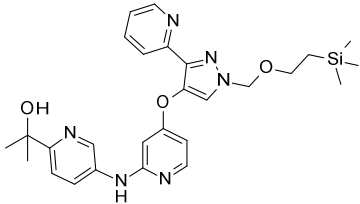
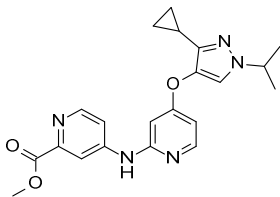
4-[[4-(1-Ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-
2-piridil]amino]benzonitrilo

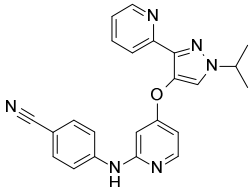
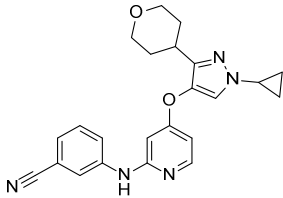
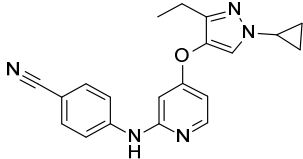


- 5 Se purga una solución de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (400 mg, 1,2 mmol), p-aminobenzonitrilo (219,9 mg, 1,9 mmol), carbonato de cesio (568,5 mg, 1,7 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (134,6 mg, 0,23 mmol)
- 10 en 1,4-dioxano (15 mL) con nitrógeno durante cinco minutos. La mezcla resultante se trata con acetato de paladio(II) (26,1 mg, 0,12 mmol) y se purga con nitrógeno durante 5 minutos. Se cierra el recipiente y se agita a 100 °C durante dos horas, luego a 80 °C durante el fin de semana. Se enfría
- 15 hasta temperatura ambiente, se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con MeOH al 5 % en DCM. Se concentra el filtrado para proporcionar el compuesto del título (467 mg; 100 % de rendimiento). MS (m/z): 402 (M+1).
- 20 Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el método de la Preparación 42.

Se indican las alteraciones de catalizador, y/o solvente.

Tabla 8:

5	Prep. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentari os
10	43	2-[5-[[4-[3-(2-Piridil)-1-(2-trimetilsililetoximetil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]-2-piridil]propan-2-ol		519 (M+1)	Tris(dibencilidena cetona)di paladio(0), tolueno
15					
20	44	4-[[4-(3-ciclopropil-1-isopropilpirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]piridin-2-carboxilato de metilo		394 (M+1)	Tris(dibencilidena cetona)di paladio(0), tolueno

5	45	4-[[4-[1- Isopropil-3- (2- piridil)pirazo 1-4-il]oxi-2- piridil]amino] benzonitrilo		397 (M+1)
10	46	3-[[4-(1- Ciclopropil-3- tetrahidropira n-4-il- pirazol-4- il)oxi-2- piridil]amino] benzonitrilo		402 (M+1)
15	47	4-[[4-(1- Ciclopropil-3- etil-pirazol- 4-il)oxi-2- piridil]amino] benzonitrilo		346 (M+1)
20				

5

48	4-[[4-[1-(Difluorometil)-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		412 (M+1)	
----	---	--	-----------	--

10

49	N-[4-[1-(Difluorometil)-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il]oxi-2-piridil]piridazina-3-amina		375 (M+1)	Tris(dibencilidena cetona)di paladio(0)
----	--	--	-----------	---

15

20

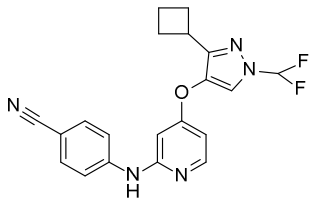
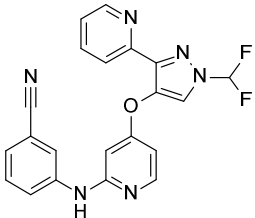
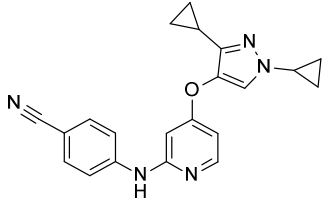
50	2-[4-[[4-(1-Ciclopropil-3-tetrahidrofuran-3-il-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]-2-piridil]propan-2-ol		422 (M+1)	
----	--	--	-----------	--

5

10

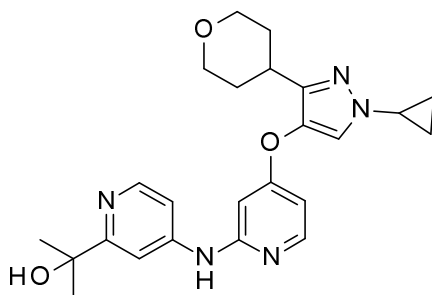
15

20

51	4-[[4-[3-Ciclobutil-1-(difluorometil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		382 (M+1)	
52	3-[[4-[1-(Difluorometil)-3-(2-piridil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		405 (M+1)	
53	4-[[4-(1,3-Diciclopropilpirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo		358 (M+1)	

Ejemplo 1

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



5 **Método 1:**

Se purga una solución de 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (45,6 g, 142,6 mmol), 2-(4-amino-2-piridil)propan-2-ol (26,0 g, 171,1 mmol) y fenato de sodio (26,5 g, 228,2 mmol) en 1,4-dioxano (456 mL) con nitrógeno durante 20 minutos. La mezcla resultante se trata con 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (8,25 g, 14,3 mmol) y bis(dibencilidenacetona)paladio (4,10 g, 7,13 mmol). Se calienta a reflujo durante 21 horas. Se enfría la reacción hasta temperatura ambiente y se agita durante la noche. Se filtra a través un tapón de CELITE® y se lava con DCM (500 mL). El filtrado se concentra en gel de sílice. Se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice con MeOH al 0 a 10 % en EtOAc. Se concentran las fracciones apropiadas y se secan al vacío durante la noche para

10

15

20

proporcionar el compuesto del título (58,7 g; 91,7 % de rendimiento). MS (m/z): 436 (M+1). Se producen varios lotes del producto utilizando el método que precede. Se disuelven los lotes combinados de los compuestos del título (92,4 g) en EtOH (1 L). La solución se trata con QUADRASIL® MP (100 g, 1,0 a 1,5 mmol/g) y se agita a 60 °C durante una hora. Se enfría a temperatura ambiente y se filtra para retirar los sólidos. Se concentra para retirar el solvente. Se disuelve el residuo en EtOH (500 mL) mientras se calienta hasta 100 °C. Luego se enfría la mezcla lentamente hasta temperatura ambiente y se agrega agua (500 mL) lentamente. La mezcla se enfría hasta 5 °C mientras se agita. Se recolecta el sólido mediante filtración y se seca al vacío a 45 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título (81,8 g). MS (m/z): 436 (M+1).

Método 2:

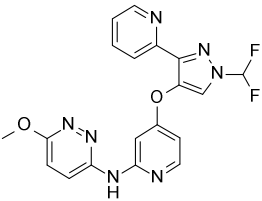
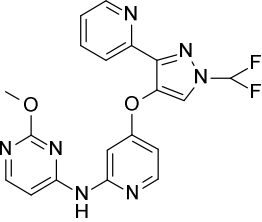
Se disuelve 2-cloro-4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-piridina (400 mg, 1,2 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) en un recipiente. Se agregan 2-(4-amino-2-piridil)propan-2-ol (266,5 mg, 1,6 mmol), carbonato de cesio (568,5 mg, 1,7 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (134,6 mg, 0,23 mmol) y se purga con nitrógeno durante 5 minutos. Se agrega acetato de paladio(II) (26,1 mg,

0,12 mmol) y se purga con nitrógeno durante 5 minutos. Se sella el recipiente y se agita a 100 °C durante la noche. La reacción se enfría hasta temperatura ambiente, se filtra a través de un tapón de CELITE® y se lava con MeOH al 5 % en DCM. Se concentra y se purifica mediante cromatografía de fase inversa (Redisep Rf Gold Columna de fase inversa C18 de alto rendimiento, 0 a 100 % ácido fórmico/acetonitrilo (ACN) en ácido fórmico/agua). Se concentran fracciones apropiadas y se secan al vacío para proporcionar el compuesto del título (341 mg; 67,3 % de rendimiento). MS (m/z): 436 (M+1).

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el **Método 2** del Ejemplo 1.

Se indican las alteraciones en la base, catalizador, ligando y/o solvente.

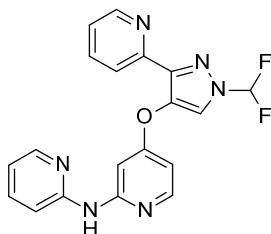
Tabla 9:

5	Ej. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):	Comentarios
10	2	N-(4-{[1-(difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)-6-metoxipiridazin-3-amina		412 (M+1)	bis(dibencilidenacetona) paladio
20	3	N-(4-{[1-(difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)-2-		412 (M+1)	bis(dibencilidenacetona) paladio

5

4

4-{ [1-(
(Difluorometil)
-3-(piridin-2-
il)-1H-pirazol-
4-il]oxi}-N-
(piridin-2-
il)piridin-2-
amina

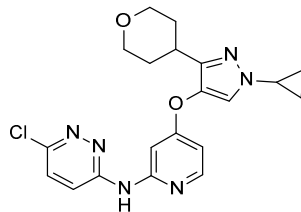


381
(M+1)

10

5

6-Cloro-N-(4-
{ [1-
ciclopropil-3-
(tetrahidro-2H-
piran-4-il)-1H-
pirazol-4-
il]oxi}piridin-
2-il)piridazin-
3-amina



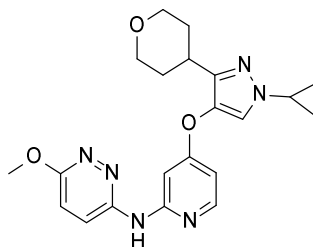
413
(M+1)

15

5

6

N-(4-{[1-
Ciclopropil-3-
(tetrahidro-2H-
piran-4-il)-1H-
pirazol-4-
il]oxi}piridin-
2-il)-6-
metoxipiridazin-
3-amina

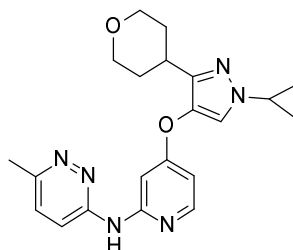


409
(M+1)

10

7

N-(4-{[1-
Ciclopropil-3-
(tetrahidro-2H-
piran-4-il)-1H-
pirazol-4-
il]oxi}piridin-
2-il)-6-
metilpiridazin-
3-amina

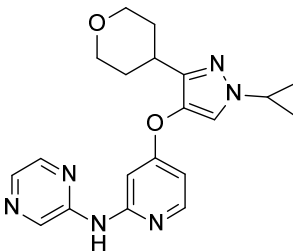


393
(M+1)

15

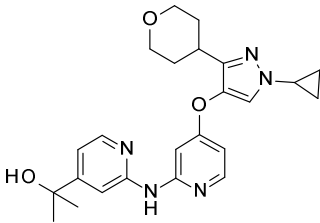
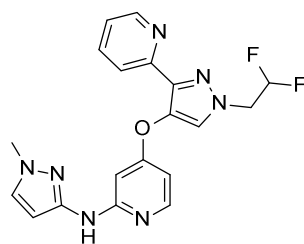
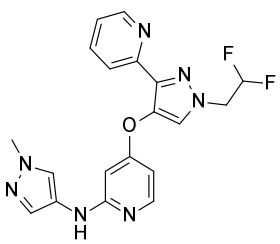
8

N-(4-{[1-
Ciclopropil-3-
(tetrahidro-2H-
piran-4-il)-1H-
pirazol-4-
il]oxi}piridin-
2-il)pirazin-2-
amina



379
(M+1)

20

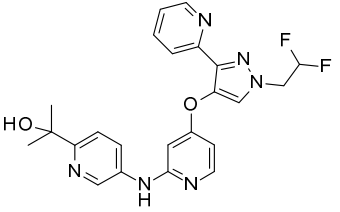
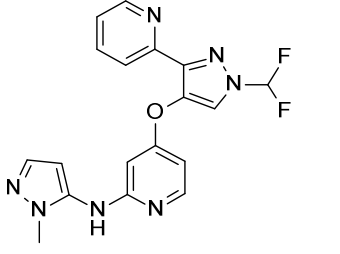
5	9	2-{2-[(4-{ [1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-4-il}propan-2-ol		436 (M+1)	
10	10	4-{ [1-(2,2-Difluoroetil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-3-il)piridin-2-amina		398 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencil idenacetona) paladio
15	11	4-{ [1-(2,2-Difluoroetil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		398 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencil idenacetona) paladio

5

10

15

20

12	2-{5-[(4-{ [1-(2,2-Difluoroetil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		453 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencilidenacetona) paladio
13	4-{ [1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-amina		384 (M+1)	bis(dibencilidenacetona) paladio

5

14	4-{[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		384 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio
15	N-(4-{[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina		382 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio
16	2-{6-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-3-il}propan-2-ol		429 (M+1)	

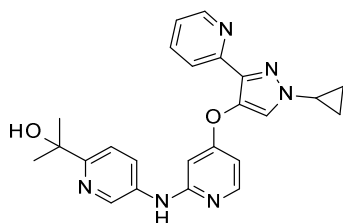
10

15

20

5

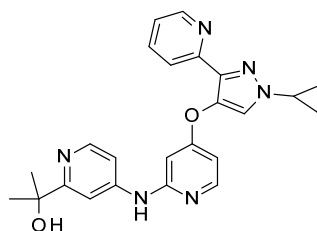
17 2-{5-[(4-{[1-(Ciclopropil-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol



429
(M+1)
)

10

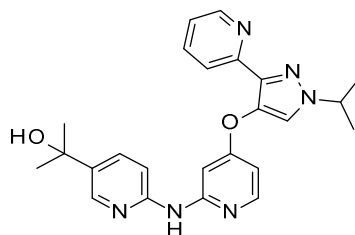
18 2-{4-[(4-{[1-(Ciclopropil-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol



429
(M+1)
)

15

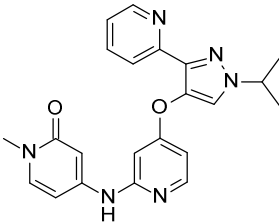
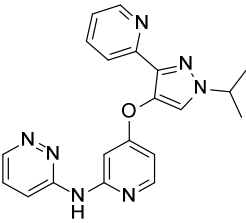
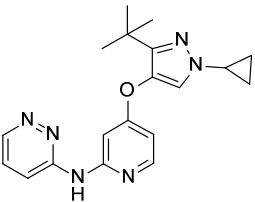
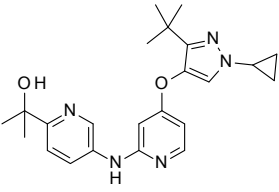
19 2-{6-[(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-3-il}propan-2-ol



431
(M+1)
)

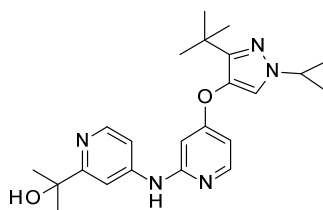
fenato de
sodio,
bis(dibencil
idenacetona)
paladio

20

5	20	1-Metil-4-[(4-{[1-(propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2(1H)-ona	 403 (M+1)
10	21	N-(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina	 374 (M+1)
15	22	N-{4-[(3-Terc-butil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}piridazin-3-amina	 351 (M+1)
20	23	2-[5-({4-[(3-Terc-butil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-2-il]propan-2-ol	 408 (M+1)

5

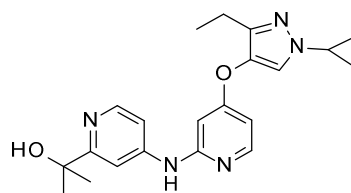
24 2-[4-({4-[(3-
Terc-butil-1-
ciclopropil-1H-
pirazol-4-
il)oxi]piridin-2-
il}amino)piridin-
2-il]propan-2-ol



408
(M+
1)

10

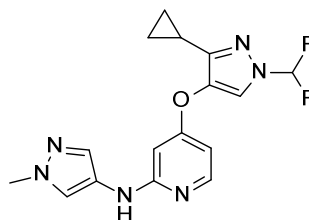
25 2-[4-({4-[(1-
Ciclopropil-3-
etil-1H-pirazol-
4-il)oxi]piridin-
2-
il}amino)piridin-
2-il]propan-2-ol



380
(M+
1)

15

26 4-{[3-
Ciclopropil-1-
(difluorometil)-
1H-pirazol-4-
il]oxi}-N-(1-
metil-1H-pirazol-
4-il)piridin-2-
amina



347
(M+
1)

bis(dibencil
idenacetona)
paladio

20

5

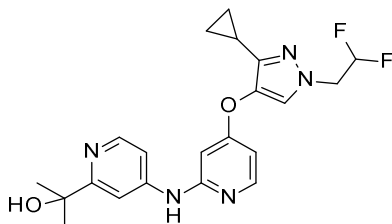
27

10

15

20

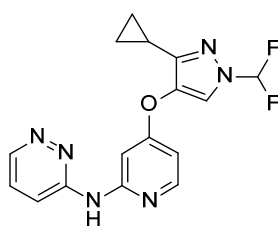
2-{4-[(4-{[3-
Ciclopropil-
1-(2,2-
difluoroetil)-
1H-pirazol-
4-il]oxi}piridi-
n-2-il)amino]piri-
din-2-il}propan-2-
ol



416
(M+1)

fenato de
sodio,
bis(dibencil
idenacetona)
paladio

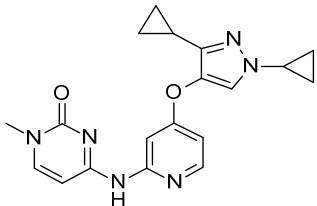
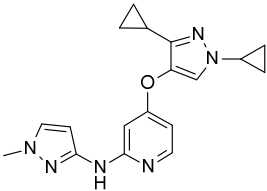
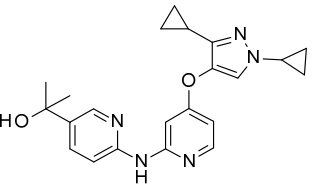
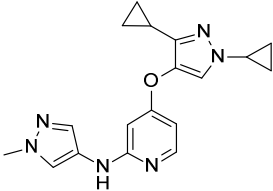
N-(4-{[3-
Ciclopropil-
1-
(difluorometi-
l)-1H-
pirazol-4-
il]oxi}piridi-
n-2-il)piridazin-
3-amina



345
(M+1)

bis(dibencil
idenacetona)
paladio

5

29	4-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)-1-metilpirimidin-2(1H)-ona		365 (M+1)	
30	4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]-N-(1-metil-1H-pirazol-3-il)piridin-2-amina		337 (M+1)	
31	2-[6-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-3-il]propan-2-ol		392 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencilidenacetona) paladio
32	4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		337 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencilidenacetona) paladio

10

15

20

5

33	4-((4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il)amino)-1-metilpiridin-2(1H)-ona		364 (M+1)	bis(dibencilidenacetona)paladio, tolueno/N-metilpirrolidona
----	--	--	--------------	---

10

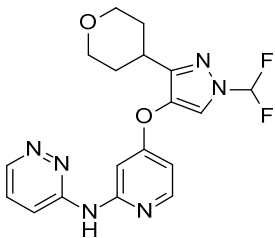
34	N-{4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}piridazin-3-amina		335 (M+1)	
----	---	--	--------------	--

15

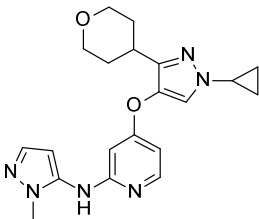
35	2-{4-[(4-{[1-(2,2-Difluoroetil)-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		460 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencilidenacetona)paladio
----	--	--	--------------	--

20

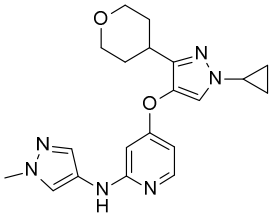
5

36	N-(4-{[1-(Difluorometil)-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)piridazin-3-amina		389 (M+1)	bis(diben cilidenac etona)pal adio
----	--	--	--------------	---

10

37	4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-5-il)piridin-2-amina		381 (M+1)	bis(diben cilidenac etona)pal adio
----	--	---	--------------	---

15

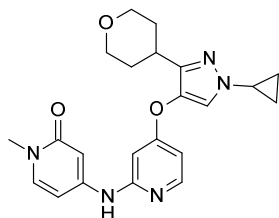
38	4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-amina		381 (M+1)	bis(diben cilidenac etona)pal adio
----	--	--	--------------	---

20

5

39

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

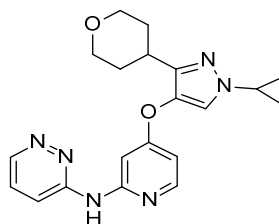


408
(M+1)

10

40

N-(4-{[1-
Ciclopropil-3-
(tetrahidro-2H-
piran-4-il)-1H-
pirazol-4-
il]oxi}piridin-2-
il)piridazin-3-
amina

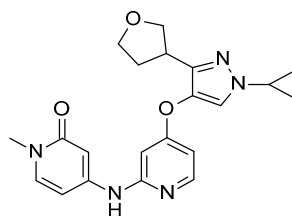


379
(M+1)

15

41

4-[(4-{[1-
Ciclopropil-3-
(tetrahidrofuran-
3-il)-1H-pirazol-
4-il]oxi}piridin-
2-il)amino]-1-
metilpiridin-
2(1H)-ona



394
(M+1)

20

5

42	N-[4-({1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il}oxi)piridin-2-il]piridazin-3-amina, isómero 2		365 (M+1)	
----	---	--	--------------	--

10

43	N-[4-({1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il}oxi)piridin-2-il]piridazin-3-amina, isómero 1		365 (M+1)	
----	---	--	--------------	--

15

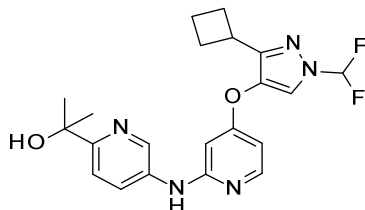
44	2-{5-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahidrofuran-3-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		422 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencil idenacetona) paladio
----	---	--	--------------	--

20

5

45

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

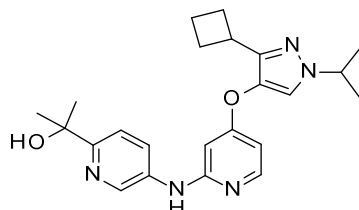


416
(M+1)

10

46

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



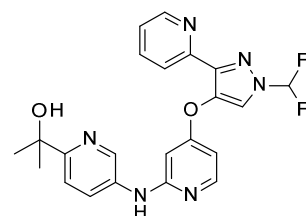
406
(M+1)

15

20

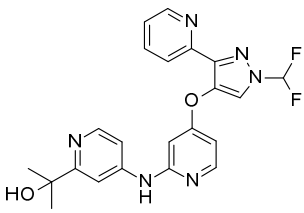
47

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

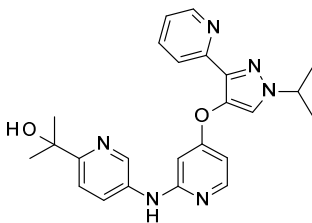


439
(M+1)

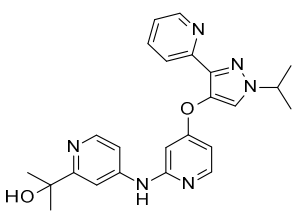
5

48	2-{4-[(4-{[1-(Difluorometil)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		439 (M+1)	
----	---	--	--------------	--

10

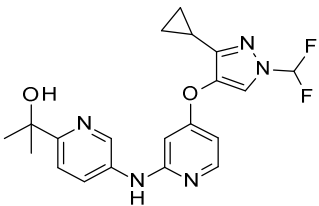
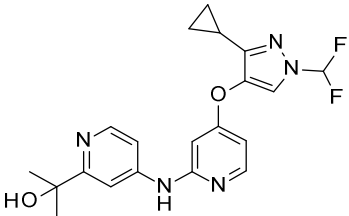
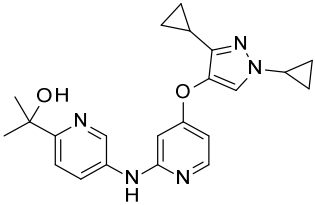
49	2-{5-[(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		431 (M+1)	
----	---	---	--------------	--

15

50	2-{4-[(4-{[1-(Propan-2-il)-3-(piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		431 (M+1)	
----	---	--	--------------	--

20

5

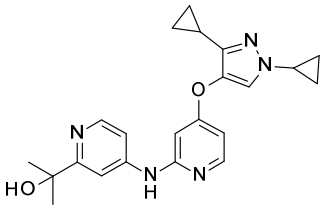
51	2-{5-[(4-{[3-Ciclopropil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		402 (M+1)	
52	2-{4-[(4-{[3-Ciclopropil-1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		402 (M+1)	
53	2-[5-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il)amino}piridin-2-il]propan-2-ol		392 (M+1)	

10

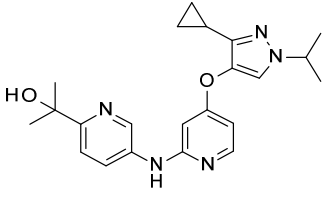
15

20

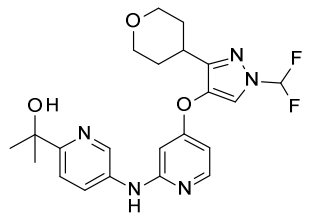
5

54	2-[4-({4-[(1,3-Diciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-2-il]propan-2-ol		392 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencilidenacetona) paladio
----	--	--	--------------	---

10

55	2-{5-[(4-{[3-Ciclopropil-1-(propan-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		394 (M+1)	fenato de sodio, bis(dibencilidenacetona) paladio
----	--	--	--------------	---

15

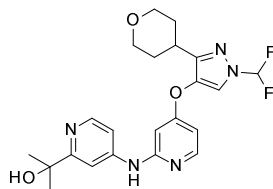
56	2-{5-[(4-{[1-(Difluorometil)-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol		446 (M+1)	
----	---	--	--------------	--

20

5

57

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

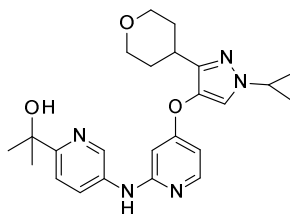


446
(M+1)

10

58

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

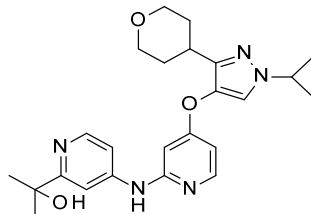


436
(M+1)

15

59

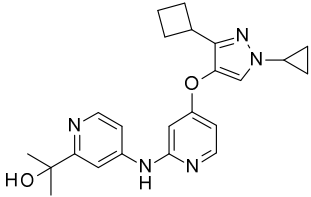
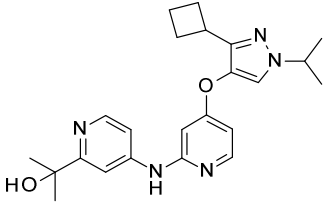
2-{4-[(4-{[1-(propan-2-il)-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol



438
(M+1)

20

5

60	2-[4-({4-[(3-Ciclobutil-1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)oxi]piridin-2-il}amino)piridin-2-il]propan-2-ol		406 (M+1)	bis(dibencilidenacetona) paladio
61	2-{4-[(4-{[3-Ciclobutil-1-(propan-2-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il}amino]piridin-2-il}propan-2-ol		408 (M+1)	

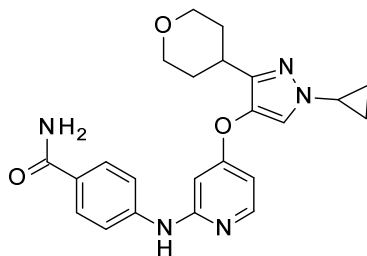
10

15

20

Ejemplo 62

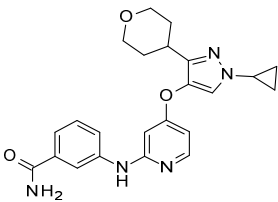
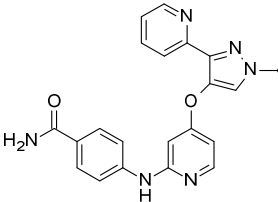
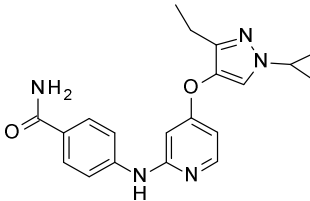
4-[(4-{[1-Ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]benzamida



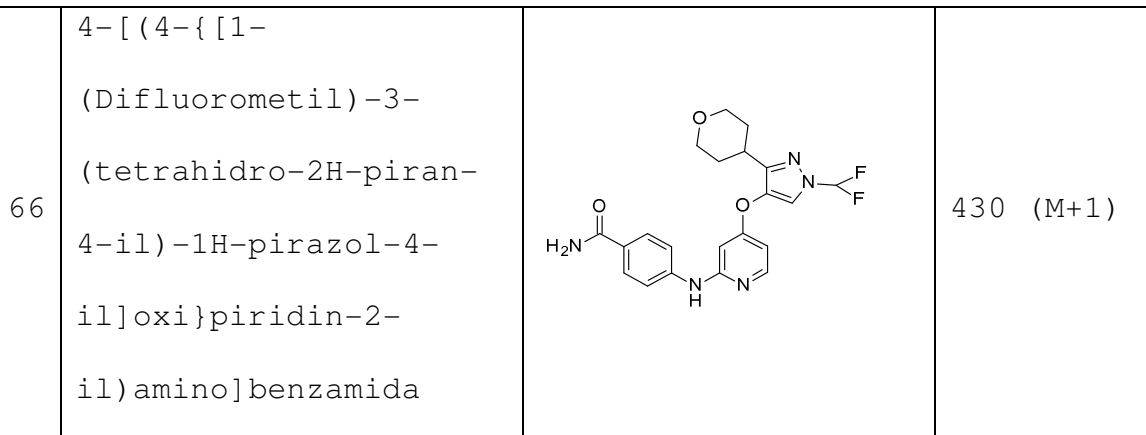
Se agrega carbonato de potasio (80,4 mg, 0,58 mmol) a una solución de 4-[[4-(1-ciclopropil-3-tetrahidropiran-4-il-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]benzonitrilo (467 mg, 1,16 mmol) en DMSO (5mL). Se agrega peróxido de hidrógeno al 30 % (1,77 mL, 17,45 mmol) y se agita la mezcla de reacción a temperatura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

Los siguientes compuestos se preparan esencialmente mediante el método del Ejemplo 62.

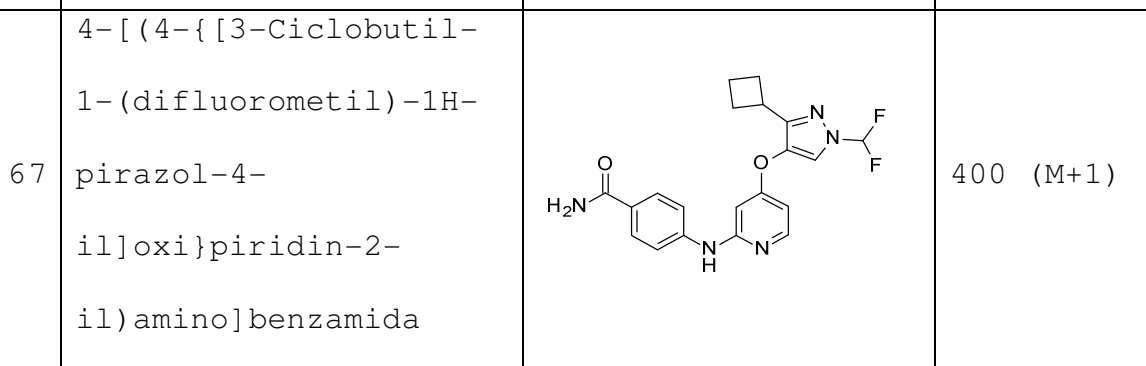
Tabla 10:

5	Ej. n.º	Nombre químico	Estructura	Datos físicos MS (m/z):
10	63	3-[(4-{[1-Ciclopropil- 3-(tetrahidro-2H- piran-4-il)-1H- pirazol-4- il]oxi}piridin-2- il)amino]benzamida		420 (M+1)
15	64	3-[(4-{[1-(Propan-2- il)-3-(piridin-2-il)- 1H-pirazol-4- il]oxi}piridin-2- il)amino]benzamida		415 (M+1)
20	65	4-({4-[(1-Ciclopropil- 3-etil-1H-pirazol-4- il)oxi]piridin-2- il}amino)benzamida		364 (M+1)

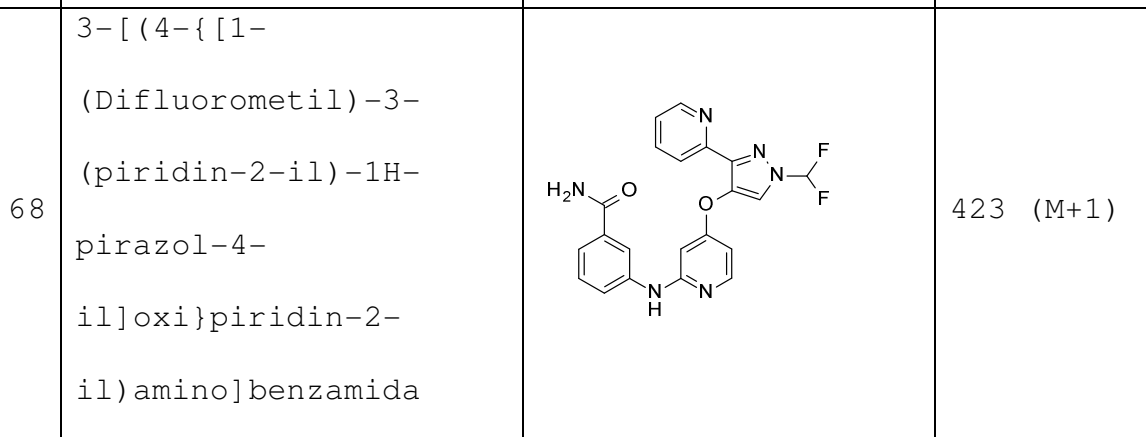
5



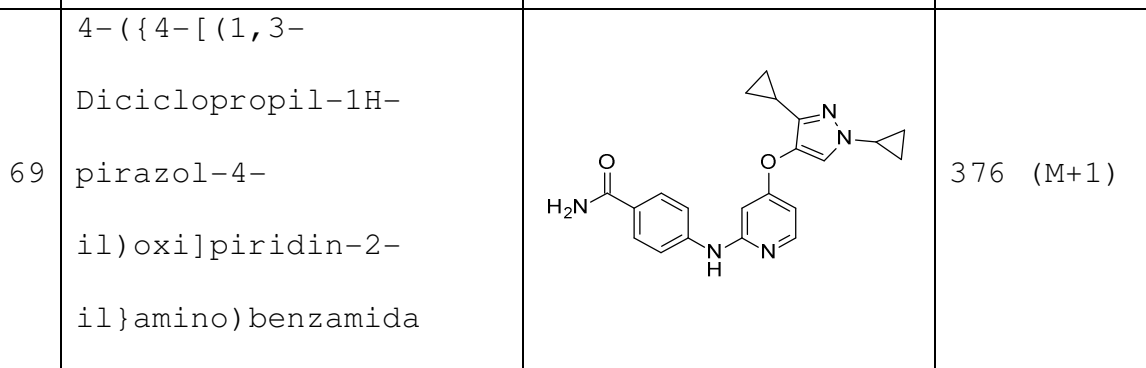
10



15

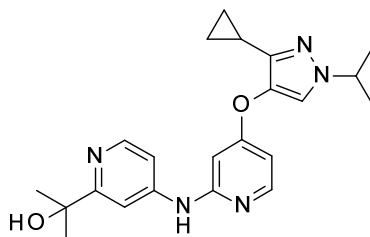


20



Ejemplo 70

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



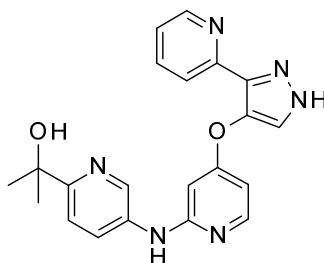
5 Se purga una solución de 4-[[4-(3-ciclopropil-1-isopropil-pirazol-4-il)oxi-2-piridil]amino]piridin-2-carboxilato de metilo (298 mg, 0,76 mmol) en THF (6 mL) en un recipiente sellado con nitrógeno. Se agrega bromuro de metilmagnesio (3M en dietiléter, 1,01 mL, 3,03 mmol) gota a

10 gota y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla se concentra a presión reducida y el residuo se diluye con DCM y bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se aísla la capa orgánica y se extrae la capa acuosa con DCM. Se combinan las capas orgánicas y se lavan con cloruro de sodio

15 acuoso saturado. Se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentra el filtrado. Se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice con MeOH al 5 a 10 % en DCM para proporcionar el compuesto del título (160 mg; 53,69 % de rendimiento). MS (m/z): 394 (M+1).

Ejemplo 71

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



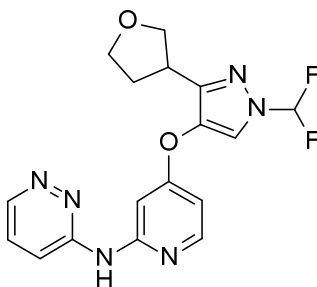
5 Se enfría una solución de 2-[5-[[4-[3-(2-Piridil)-1-(2-trimetilsililetoxi-metil)pirazol-4-il]oxi-2-piridil]amino]-2-piridil]propan-2-ol (500 mg, 0,96 mmol) en ácido trifluoroacético (3 mL) hasta 0 °C en un baño de hielo. Se agrega trietilsilano (1 mL, 6,24 mmol). Se agita la mezcla de

10 reacción a temperatura ambiente durante la noche. El residuo se concentra y se purifica mediante cromatografía de fase inversa (Redisep Rf Gold Columna de fase inversa C18 de alto rendimiento, bicarbonato de amonio 10 mM al 0 a 100 % en ACN). Se concentran las fracciones apropiadas para retirar el

15 ACN. La mezcla acuosa restante se extrae con DCM, se aísla la capa orgánica y se seca sobre sulfato de sodio. Se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida para proporcionar el compuesto del título (168 mg; 44,9 % de rendimiento). MS (m/z): 389 (M+1).

Ejemplo 72

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



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

10 Condiciones de purificación: CHIRALPAK® IC; Fase móvil: isopropanol al 30 % que contiene isopropilamina al 0,2 % en dióxido de carbono; Tasa de flujo: 70 g/minuto; UVW: 280 nm; Tiempo de retención: 3,93 minutos.

El siguiente compuesto se prepara esencialmente mediante
15 el método del Ejemplo 72.

Se indican las condiciones alternativas de purificación.

15

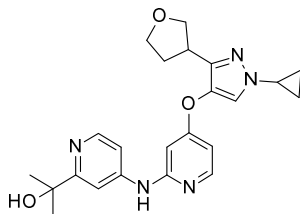
20

5

75

10

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



CHIRALCEL® OJ-H;
fase móvil:
isopropanol al
20 % que
contiene
isopropilamina
al 0,2 % en
dióxido de
carbono; tasa de
flujo: 70
g/minuto; UVW:
225 nm; tiempo
de retención:
2,67 minutos

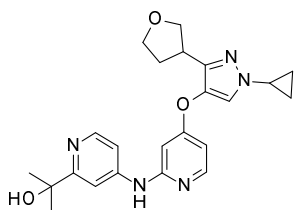
MS
(m/z):
422
(M+1)

15

76

20

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



CHIRALCEL® OJ-H;
fase móvil:
isopropanol al
20% que contiene
isopropilamina
al 0,2 % en
dióxido de
carbono; tasa de
flujo: 70
g/minuto; UVW:
225 nm; tiempo
de retención:
3,59 minutos

MS
(m/z):
422
(M+1)

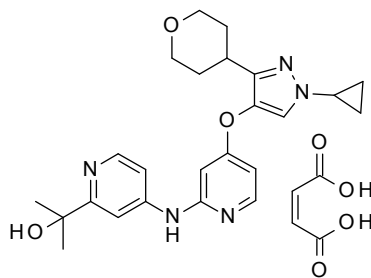
Procedimiento de recolección de difracción de polvo de rayos

X para los ejemplos 77 a 79

Se obtienen los patrones de XRD de sólidos cristalinos en un difractómetro de polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor
 5 equipado con una fuente de CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. Se analiza la muestra entre 4 y 40° en 2 θ , con un tamaño de paso de 0,009° en 2 θ y una tasa de análisis de 0,5 segundos/paso y con 0,6 mm de divergencia, 5,28 anti-dispersión fija y 9,5 mm de hendidura.
 10 Se coloca el polvo seco en un soporte de muestra QUARTZ y se obtiene una superficie lisa utilizando un portaobjetos de vidrio. Se recolectan los patrones de difracción de forma cristalina a temperatura ambiente y humedad relativa.

15 **Ejemplo 77**

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



20 Se agrega 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxy}piridin-2-il)amino]piridin-2-

il}propan-2-ol (142 mg) en ACN (2 mL). El sólido se disuelve completamente al agitar a 80 °C/1000 rpm. Se agrega ácido maleico (48 mg, 1,20 equivalentes, en 1 mL de ACN a 80 °C) a la solución resultante. Al principio la mezcla es turbia, pero rápidamente se torna una solución transparente. Se deja de calentar y agitar. La solución se enfría hasta temperatura ambiente. Se agregan otros 2 mL de ACN para suspender el sólido. El sólido blanco se aísla mediante filtrado al vacío y se seca el sólido ubicado sobre el filtro durante 15 minutos bajo una corriente de aire. El sólido resultante se seca en una estufa de vacío a 65 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título (132 mg, 73,4 % de rendimiento). El porcentaje teórico de un ion de ácido maleico en la sal formada para una mono sal es de 21,0 %. El análisis de contraión mediante HPLC determina que el porcentaje real de ion de ácido maleico en la sal formada es de 17,2 %. El análisis de contraión indica una mono sal.

Difracción de polvo de rayos X del Ejemplo 77

Una muestra preparada del **Ejemplo 77** se caracteriza mediante un patrón de XRD utilizando radiación CuK α como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como los descritos en la Tabla 13 a continuación, y en particular que tiene picos a 9,6° en combinación con uno o más de los picos

seleccionados del grupo que consiste en 12,5°, 17,5°, y 16,9°; con una tolerancia de 0,2 grados para los ángulos de difracción.

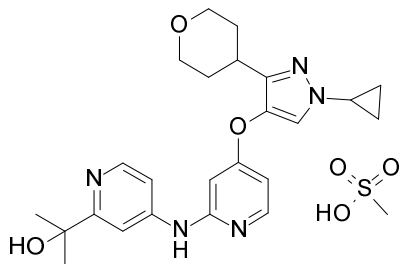
Tabla 12: Picos difracción de polvo de rayos X del Ejemplo 77

5		
	Pico	Ángulo (°2-Theta) +/- Intensidad relativa (% del pico más intenso)
	1	9,6 100,0
	2	12,5 88,2
10	3	17,5 74,4
	4	16,9 55,8
	5	12,9 54,0
	6	20,1 45,9
	7	21,5 44,1
15	8	19,2 36,4
	9	20,9 35,5
	10	23,5 32,0

20

Ejemplo 78

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



Se agrega 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-
 piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-
 il}propan-2-ol (113 mg) en acetona (2 mL). El sólido se
 5 disuelve completamente mientras se agita a 60 °C/1000 rpm. Se
 agrega ácido metanosulfónico (21 µL, 1,24 equivalentes) a la
 solución resultante. Se deja de calentar y agitar. La
 solución se enfría hasta temperatura ambiente. Se agregan
 otros 3 mL de acetona para suspender el sólido. El sólido
 10 blanco se aísla mediante filtrado al vacío y se seca el
 sólido ubicado sobre el filtro durante 15 minutos bajo una
 corriente de aire. El sólido resultante se seca en una estufa
 de vacío a 65 °C durante la noche para proporcionar el
 compuesto del título (87 mg, 63,08 % de rendimiento). El
 15 porcentaje teórico de un ion de ácido metanosulfónico en la
 sal formada para una mono sal es de 18,1 %. El análisis de
 contraión mediante HPLC determina que el porcentaje real de
 ion de ácido metanosulfónico en la sal formada es de 16,2 %.
 El análisis de contraión indica una mono sal.

20

Difracción de polvo de rayos X del Ejemplo 78

Una muestra preparada del **Ejemplo 78** se caracteriza mediante un patrón de XRD utilizando radiación CuK α como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como los descritos en la Tabla 14 a continuación, y en particular que

5 tiene picos a 7,0° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 14,1°, 10,8° y 18,6°; con una tolerancia de 0,2 grados para los ángulos de difracción.

Tabla 13: Picos difracción de polvo de rayos X del **Ejemplo 78**

10

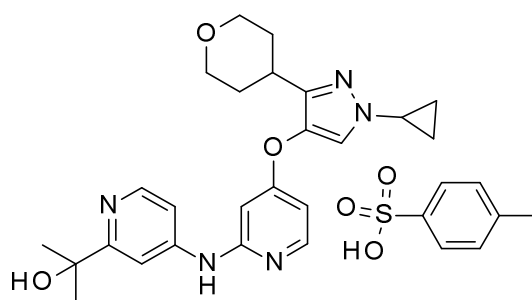
15

20

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

Ejemplo 79

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



5

Se agrega 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol (122 mg) en EtOAc (2 mL). El sólido se disuelve por completo mientras se agita a 80 °C/1000 rpm. Se

10 agrega monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (1,23 equivalentes, en 1 mL de EtOAc a 80 °C) a la solución resultante. Se suspende la mezcla a 80 °C/1000 rpm durante 30 minutos. Se apaga la fuente de calor y se sigue agitando la mezcla a 1000 rpm mientras se enfría hasta temperatura

15 ambiente. El sólido blanco resultante se aísla mediante filtrado al vacío y se seca el sólido ubicado sobre el filtro durante 15 minutos bajo una corriente de aire. El sólido resultante se seca en una estufa de vacío a 65 °C durante la noche para proporcionar el compuesto del título (159 mg,

20 93,40 % de rendimiento). El porcentaje teórico de un ion de

ácido p-toluenosulfónico en la sal formada para una mono sal es de 29,3 %. El análisis de contraión mediante HPLC determina que el porcentaje real de ion de ácido p-toluenosulfónico en la sal formada es de 28,3 %. El análisis de contraión indica una mono sal.

Difracción de polvo de rayos X del Ejemplo 79

Una muestra preparada del **Ejemplo 79** se caracteriza mediante un patrón de XRD utilizando radiación CuK α como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como los descritos en la Tabla 15 a continuación, y en particular que tiene picos a 17,8° en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 19,7°, 18,4° y 22,0°; con una tolerancia de 0,2 grados para los ángulos de difracción.

Tabla 14: Picos difracción de polvo de rayos X del **Ejemplo 79**

Pico	Ángulo (°2-Theta) +/-	Intensidad relativa (% del pico más intenso)
1	17,8	100,0
2	19,7	78,0
3	18,4	65,8
4	22,0	53,0

5

5	20,3	50,5
6	10,1	48,0
7	16,4	46,5
8	11,5	24,6
9	7,4	14,2
10	7,8	13,1

La señalización mediante la senda del TGF β se ha asociado con el cáncer y la progresión tumoral en diversas indicaciones (Elliott et. ál. (2005) J Clin Oncol 23:2078; Levy et. ál. (2006) Cytokine & Growth Factor Rev 17:41-58). Existen varios tipos de cáncer en los cuales los ligandos del TGF β producidos por el tumor o el estroma en el microentorno del tumor pueden estar involucrados en la progresión tumoral. Las células del cáncer de próstata de ratas MATLyLu (Steiner y Barrack (1992) Mol. Endocrinol 6:15-25) y las células de cáncer de mama humanas MCF-7 (Arteaga, et ál. (1993) Cell Growth and Differ. 4:193-201) se tornaron más tumorígenas y metastásicas después de la transfección con un vector que expresaba el TGF β 1 de ratón. El TGF- β 1 ha sido asociado con angiogénesis, metástasis y diagnósticos desfavorables en cáncer de próstata y gástrico avanzado en humanos (Wikstrom, P., et ál. (1998) Prostate 37: 19-29; Saito, H. et ál. (1999)

Cancer 86: 1455-1462). En el cáncer de mama, el diagnóstico desfavorable se asocia a TGF- β elevado (Dickson, et ál. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:837-841; Kasid, et ál. (1987) Cancer Res. 47:5733-5738; Daly, et ál. (1990) J. Cell Biochem. 43:199-211; Barrett-Lee, et ál. (1990) Br. J Cancer 61:612-617; King, et ál. (1989) J. Steroid Biochem. 34:133-138; Welch, et ál. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7678-7682; Walker, et ál. (1992) Eur. J. Cancer 238:641-644) y la inducción del TGF- β 1 mediante tratamiento con tamoxifeno (Butta, et ál. (1992) Cancer Res. 52:4261- 4264) se ha asociado con el fracaso del tratamiento con tamoxifeno para el cáncer de mama (Thompson, et ál. (1991) Br. J. Cancer 63:609-614). Los anticuerpos anti TGF β 1 inhiben el crecimiento de células del cáncer de mama humanas MDA-231 en ratones atímicos (Arteaga, et ál. (1993) J. Clin. Invest. 92:2569-2576), un tratamiento que se relaciona con un aumento en la actividad del linfocito citolítico natural del bazo. Las células CHO transfectadas con TGF β 1 latente también exhibieron menor actividad de NK y un aumento en el crecimiento tumoral en ratones desnudos (Wallick, et ál. (1990) J. Exp. Med. 172:1777-1784). Por lo tanto, el TGF- β secretado por los tumores de mama pueden causar un supresión inmune endocrina. Se ha demostrado que las altas concentraciones de plasma del TGF β 1 indican un diagnóstico

desfavorable para pacientes de cáncer de mama avanzado (Anscher, et ál. (1993) N. Engl. J. Med. 328:1592–1598). Los pacientes con TGF β circulante alto antes de una dosis alta de quimioterapia y trasplante de médula ósea autólogo tienen un

5 alto riesgo de enfermedad venooclusiva hepática (15 a 50 % de todos los pacientes tienen una tasa de mortalidad de hasta 50 %) y neumonitis intersticial idiopática (40 a 60 % de todos los pacientes). La implicación de estos hallazgos es 1) que esos niveles elevados de plasma del TGF β se pueden

10 utilizar para identificar pacientes en riesgo y 2) que la reducción de la señalización del TGF β podría disminuir la morbilidad y mortalidad de estos tratamientos comunes para los pacientes con cáncer de mama.

Las publicaciones recientes también sugieren que la

15 señalización de TGF β puede ser importante al llevar la resistencia tumoral al estándar de las terapias de cuidado, lo que incluye quimioterapias y receptor de tirosinas cinasas (WO2012138783). Específicamente, en el cáncer de colon, se ha demostrado que un patrón específico de la expresión génica

20 aísla a un grupo de pacientes resistentes a tratamientos primarios comunes. Estas células tumorales recuperan la susceptibilidad a la terapia cuando se bloquea la senda del TGF β con un inhibidor de molécula pequeña específico para TGF β RI (Huang, et. ál. (2012) Cell 151:937–950; Sadanandam

et. ál. (2013) Nat Med 19:619–625; Vermeulen et. ál. (2013) Nat Ned 19:614–618; Roepman et. ál. (2014) 134:552–562).

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos del sistema hematopoyético en el compartimiento mieloide y se

5 caracterizan por la producción ineficaz de células mieloides. El MDS se relaciona con alternaciones de la senda del TGF β representadas por niveles de SMAD7 reducidos. La SMAD7 es una SMAD inhibidora que inhibe la señalización de la SMAD mediada por el TGF β y se encuentra después de la señalización

10 activada por ligando a través de TGF β RI y TGF β RII. Entonces se cree que la sobre-expresión de la SMAD7 causa la sobre-activación de señalización del TGF β en los MDS, y este fenotipo puede revertirse al tratarse con un inhibidor de molécula pequeña del TGF β RI (Zhou et. ál. (2011) Cancer Res.

15 71:955–963). De manera similar, en el glioblastoma (GBM), los niveles de ligandos del TGF β son elevados y se relacionan con la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que un producto terapéutico de oligonucleótido antisentido, AP1002, se encuentra potencialmente activo en un subgrupo de

20 pacientes con GBM (Bogdahn et. ál. (2011). Curr Pharm Biotechnol). En el melanoma, la señalización de la senda del TGF β también se ha relacionado a la resistencia a los inhibidores BRAF y MEK (Sun et. ál. (2014) Nature. 508:118–122).

Muchas células malignas secretan el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), un inmunosupresor potente, lo que sugiere que la producción del TGF β puede representar un mecanismo de escape significativo del tumor por parte de la inmunovigilancia del hospedador (Flavell et. ál. (2010) Nat Rev Immunol 10:554-567; Kast et. ál. (1999) Leukemia 13:1188-1199). El establecimiento de una subpoblación de leucocitos con señalización del TGF β interrumpida en el hospedador que carga el tumor ofrece un medio potencial para la inmunoterapia del cáncer solo o combinado con otra u otras inmunoterapias, por ejemplo, combinado con uno o más inhibidores de PD-1 tales como nivolumab, pembrolizumab, inhibidores de PD-L1, vacunas contra el cáncer y moléculas captadoras inmunes específicas como IMCgp100. Se ha demostrado de forma preclínica que el ligando del TGF β producido por linfocitos antagoniza la inmunovigilancia tumoral (Donkor et. ál. (2012) Development. Oncoimmunology 1:162-171, Donkor et. ál. (2011) Cytokine Immunity 35:123-134); se ha demostrado que la interrupción de este eje de forma preclínica proporciona un beneficio anti-tumoral en modelos murinos e in vitro (Zhong et. ál. (2010) Cancer Res 16:1191-1205; Petrausch et. ál. (2009) J Immunol 183:3682-3689); Wakefield et. ál. (2013) Nat. Rev Cancer 13:328-341). Un modelo animal transgénico con

señalización del TGF β interrumpida en linfocitos T es capaz de erradicar un tumor linfomatoso que sobre-expresa a TGF β que normalmente sería letal, EL4 (Gorelik y Flavell, (2001) Nature Medicine 7(10): 1118-1122). La regulación por

5 disminución de la secreción del TGF β en células tumorales da como resultado la restauración de la inmunogenicidad en el hospedador, mientras que la insensibilidad de los linfocitos T al TGF β da como resultado una diferenciación y autoinmunidad acelerada, cuyos elementos pueden ser

10 necesarios para combatir tumores que expresan su propio antígeno en un hospedador tornado tolerante. Los efectos inmunosupresores del TGF β también están implicados en una sub-población de pacientes de VIH con una respuesta inmune menor que la predicha según sus conteos de linfocitos T

15 CD4/CD8 (Garba, et ál. J. Immunology (2002) 168: 2247-2254). Un anticuerpo que neutraliza el TGF β fue capaz de revertir el efecto en un cultivo, lo que indica que los inhibidores de la señalización del TGF β pueden ser útiles para revertir la inmunosupresión presente en este sub-grupo de pacientes de

20 VIH.

Durante las primeras etapas de la carcinogénesis, el TGF β 1 puede actuar como un potente supresor tumoral y puede mediar las acciones de algunos agentes quimiopreventivos. Sin

embargo, en algún momento durante el desarrollo y la progresión de los neoplasmas malignos, parece que las células tumorales escapan de la inhibición del crecimiento dependiente del TGF β en paralelo con la aparición de TGF β bioactivo en el microentorno. Las funciones dobles de supresión tumoral/estimulación tumoral del TGF β han sido dilucidadas de forma más clara en un sistema transgénico que sobreexpresa el TGF β en queratinocitos. Mientras que los transgénicos eran más resistentes a la formación de lesiones de la piel benignas, la tasa de conversión metastásica en los transgénicos aumentó dramáticamente (Cui, et ál (1996) Cell 86(4):531-42). La producción de TGF β 1 por parte de células malignas en tumores primarios parece aumentar a medida que evoluciona el tumor y llega a etapas más avanzadas. Los estudios sobre muchos de los cánceres epiteliales más graves sugieren que el aumento en la producción del TGF β por parte de cánceres humanos ocurre como un evento relativamente tardío durante la progresión tumoral. Además, este TGF β asociado al tumor les proporciona una ventaja selectiva a las células tumorales y promueve la progresión del tumor. Los efectos del TGF β en las interacciones célula/célula y célula/estroma dan como resultado una mayor tendencia a la invasión y metástasis. El TGF β asociado a tumores puede

permitir que las células tumorales escapen de la inmunovigilancia ya que es un inhibidor potente de la expansión clónica de los linfocitos activados. También se ha demostrado que el TGF β inhibe la producción de angiostatina.

- 5 La modalidades terapéuticas del cáncer, tales como terapia de radiación y quimioterapia, inducen la producción del TGF β activado en el tumor, y por lo tanto seleccionan el brote de células malignas que son resistentes a los efectos inhibidores del crecimiento del TGF β . Por lo tanto, estos
- 10 tratamientos anticancerígenos aumentan el riesgo y aceleran el desarrollo de tumores con un aumento en el crecimiento e invasión. En esta situación, los agentes que tienen como objetivo la transducción de la señal mediada por el TGF β pueden ser una estrategia terapéutica muy eficaz. Se ha
- 15 demostrado que la resistencia de las células tumorales al TGF β refuta muchos de los efectos citotóxicos de la terapia de radiación y la quimioterapia y la activación dependiente del tratamiento del TGF β en el estroma puede incluso ser perjudicial ya que puede tornar el microentorno más propicio
- 20 a la progresión tumoral y contribuye al daño del tejido lo que lleva a la fibrosis. Es probable que el desarrollo de los inhibidores de la transducción de señal del TGF β beneficie el

tratamiento del cáncer avanzado solo y combinado con otras terapias.

De manera adicional, se sabe en la técnica que la señalización del TGF β está involucrada en condiciones
 5 fibróticas tales como fibrosis hepática y enfermedad renal crónica. Véanse por ejemplo, Ueha S, et. ál. 2012. *Front Immunol.* 3:71. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis; Bottinger et ál. 2002. *J Amer Soc Nephrol.* 13:2600. TGF- β Signaling in Renal
 10 Disease; Trachtman H., et ál. 2011. *Kidney International* 79:1236. A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF- β antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis; y Rosenbloom J, et. ál. 2010. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular
 15 mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med* 152: 159-166.

Los siguientes ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados inhiben al TGF β R1 en un ensayo bioquímico, a nivel celular, y en un modelo animal.

20 **Ensayo bioquímico para evaluar la actividad de TGF β R1**

El propósito de este ensayo in vitro es identificar los compuestos que inhiben el TGF β R1.

Purificación y expresión de proteínas

Se inserta la secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 200 a 503 del TGF β R1 humano (NM_004612.2) donde se cambió el aminoácido Thr de la posición 204 a Asp en el vector PFASTBAC™1 (Invitrogen, n.º de Cat 10360-014) con la
5 etiqueta HIS N terminal. Se genera el baculovirus conforme al protocolo del Sistema de Expresión de Baculovirus BAC-TO-BAC® (Invitrogen, n.º de Cat 10359-016). Se infectan las células Sf9 a $1,5 \times 10^6$ células/mL utilizando 15 mL de virus P1 por litro de cultivo y se incuba a 28 °C durante 48 horas. Se
10 cosechan las células y se almacenan a -80 °C para la posterior purificación de proteínas. Se realiza la purificación de proteínas a 4 °C. Se suspenden los gránulos del cultivo de 2L en 100 mL de amortiguador A (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, imidazol 5 mM, glicerol
15 al 10 %) que contiene Triton X-100 al 0,2 % y un cóctel inhibidor completo de proteasa libre de EDTA de Roche y se homogeniza. Se clarifican los lisados de células mediante centrifugado en un rotor Bechman JA-18 durante 45 minutos a 16 500 rpm. Se incuba el sobrenadante con 5 mL de resina de
20 afinidad metálica Ni-NTA (Qiagen) durante tres horas. Se coloca la resina en una columna y se lava con el amortiguador A. Se eluye la proteína HIS-TGF β R1(200-503)(T204D) con un gradiente de imidazol 0 a 400 mM en el amortiguador A. Se acumulan y concentran las fracciones que contienen HIS-

TGF β R1(200-503)(T204D) y se cargan en una columna HiLoad 16.600 Superdex 200 (GE Healthcare Bioscience). Se eluye la columna con un amortiguador de depósito (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, DTT 1 mM). Se acumulan y concentran las
5 fracciones que contienen HIS-TGF β R1(200-503)(T204D). Se determina la concentración de proteínas mediante UV280. Se divide la proteína de forma proporcional y se almacena a -80 °C.

10 Condiciones del ensayo TR-FRET

Se preincuban compuestos con His-TGF β R1(200-503)(T204D) recombinante y anticuerpos de detección Eu-anti-HIS (InVitrogen, n.º de Cat PV5597) en microplacas negras de media área. Se preparan disoluciones seriales del compuesto a
15 partir de los compuestos de prueba madre 1 mM en DMSO. Se diluye de forma serial la solución madre en 3 veces DMSO para obtener una curva de disolución de diez puntos con concentraciones finales del compuesto que varían entre 2 μ M y 0,1 nM. La concentración final de DMSO en el ensayo es de
20 4 %. Se comienza la reacción agregando un indicador de quinasas (KinaseTracer 178, Life Technologies R9080A, InVitrogen). Tras 45 a 60 minutos, se determina la fluorescencia en un lector de placas.

Se calcula el porcentaje de inhibición de los grupos tratados con el compuesto en relación con el grupo de inhibición mínima (solo DMSO, sin tratar). Se calcula la IC₅₀ absoluta mediante una ecuación logística no lineal de 4 parámetros donde la IC₅₀ absoluta = concentración que provoca el 50 % de inhibición usando software de análisis de datos ActivityBase. Los resultados de estos ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados son inhibidores efectivos del TGFβR1. Por ejemplo, todos los compuestos ejemplificados presentan valores de IC₅₀ menores que 1 μM. Específicamente, la IC₅₀ para el Ejemplo 1 es 0,027 μM.

Ensayo celular de reportero de luciferasa para determinar la actividad de TGFβR1

El propósito de este ensayo es identificar los compuestos que interfieren de forma selectiva con la expresión de genes dependientes de SMAD 2,3 en ensayos celulares que demuestran que inhiben el TGFβR1 a nivel celular.

Se manipulan las células HEK293 (ATCC, CRL-1573) para que expresen la luciferasa de luciérnaga de un promotor con respuesta a SMAD 2,3 en respuesta a la estimulación con TGFβ. Dicha línea celular se podrá generar mediante infección con partículas lentivirales (SA Biosciences) y selección para

obtener resistencia a la puromicina. Se colocan en placas las células HEK293_SMAD 2/3 de soluciones madre congeladas listas para ensayos a 15 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en un medio OPTI-MEM® con suero bovino fetal al 10 %. Después de 72 horas, se cambia el medio por OPTI-MEM® con suero albúmina bovino al 0,1 %. Se preparan los compuestos de prueba en DMSO para producir soluciones madre 10 mM. Se diluyen de forma serial las soluciones madre en 3 veces DMSO para obtener una curva de disolución de diez puntos con concentraciones finales del compuesto que varían entre 20 μ M y 1 nM y una concentración final de DMSO en el ensayo de 0,5 %. Se agregan los compuestos de prueba y después de equilibrarlos durante una hora, se agrega TGF β (concentración final = 2 nM, R&D Systems).

Tras 24 horas, se agrega un amortiguador de lisis [Glo Lysis Buffer (n.º de Cat E2661)] y un reactivo de luciferasa [Promega Bright Glo Luciferase Reagent (n.º de Cat E2620)] a cada pocillo para duplicar el volumen del pocillo. Se transfieren las alícuotas (80 μ L) a placas de fondo sólido blanco para determinar la luminiscencia en un lector de placas (Filtro de emisión: Luminescence 700, lectura de 1 segundo). Se calcula el porcentaje de inhibición para los grupos tratados con el compuesto en relación con el grupo de inhibición mínimo (solo DMSO, sin tratar). Se calcula la IC₅₀

relativa para cada compuesto de un estudio de respuesta a la dosis y es la concentración necesaria para alcanzar el 50 % de inhibición. Se ingresan los datos generados en los estudios de respuesta a la dosis en una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando software de análisis de datos ActivityBase. Los resultados de estos ensayos demuestran que los compuestos ejemplificados son inhibidores efectivos de la actividad de reporteros de luciferasa de las células HEK293_SMAD2/3 estimuladas con TGF β . Por ejemplo, todos los compuestos ejemplificados presentan valores de IC₅₀ menores que 1 μ M. Específicamente, la IC₅₀ para el Ejemplo 1 es 0,0824 μ M ($\pm$ 0,005, n=2).

Ensayo IVTI

El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la expresión de pSMAD2 en tumores en un modelo animal singénico EMT6-LM2, es decir, el ensayo mide la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la señalización de TGF β R1 en un modelo animal con tumor sólido.

Generación de células EMT6-LM2

Se implantan las células EMT-6 (ATCC, CRL-2755) de forma subcutánea (5 x 10⁵/animal) en el flanco de ratones

BALB/cAnNHsd inmunológicamente competentes (Harlan Laboritories). Cuando los tumores llegan a aproximadamente 3000 mm³, se sacrifican los animales mediante asfixia con CO₂. Se aíslan los pulmones de los animales con tumores y se
 5 colocan en cultivo. Se homogenizan con cuidado los pulmones para crear una suspensión de célula única. Se cultivan las células en un medio de cultivo (IMDM, FBS al 10 %) y se aíslan las células de tumores para obtener células EMT6-LM1. Se repite el proceso anterior utilizando las células
 10 EMT6-LM1 para el implante y así generar células EMT-LM2.

Fosfo HIS-SMAD2 purificada (pSMAD2)

Se inserta la secuencia de nucleótidos que codifica el SMAD2 humano de cadena completa (NM_005901.5) en un vector
 15 PFASTBACHTA™ (Invitrogen, n.º de Cat 10584-027), lo que resulta en la construcción de baculovirus para expresar la proteína HIS-SMAD2. Se inserta la secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 148 a 503 del TGFβR1 humano (NM_004612.2) donde se cambió el aminoácido Thr de la
 20 posición 204 a Asp en el vector PFASTBACHTA™ (Invitrogen, n.º de Cat 10584-027), lo que resulta en la construcción de baculovirus para expresar la proteína HIS-TGFβR1(148-503)(T204D). Se genera el baculovirus conforme al protocolo del Sistema de Expresión de Baculovirus BAC-TO-BAC®

(Invitrogen). Se infectan las células Sf9 a $1,5 \times 10^6$ células/mL utilizando 10 mL de virus P1 de HIS-SMAD2 y virus P1 de HISTGF β R1(148-503)(T204D) por litro de cultivo y se incuban a 28 °C durante 45 horas. Se agrega ácido okadoico a una concentración final de 0,1 μ M. Después de tres horas adicionales de incubación, se cosechan las células y se almacenan a -80 °C para la posterior purificación de proteínas. Se realiza la purificación de proteínas a 4 °C. Se someten los gránulos de células congeladas del cultivo de 6 L a lisis mediante incubación con agitación en 300 mL de amortiguador A frío (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, imidazol 5 mM, glicerol al 10 %, ácido okadoico 0.1 μ M) que contiene TRITON® X-100 al 0,1 % y un cóctel inhibidor completo de proteasa libre de EDTA de Roche y se homogeniza. Se clarifican los lisados de células mediante centrifugado en un rotor Bechman JA-18 durante 45 minutos a 16 500 rpm. Se incuba el sobrenadante con 10 mL de resina de afinidad metálica TALON (Clontech, n.º de Cat 635504) durante dos horas. Se lava el lote con 100 mL de amortiguador A con TRITON® X-100 al 0,1 %. Se coloca la resina en una columna y se lava con el amortiguador A. Se eluye la proteína HIS-SMAD2 con un gradiente de imidazol 0 a 100 mM en el amortiguador A. Se acumulan las fracciones que contienen fosfo HIS-SMAD2 y se suplementan con

ácido okadoico 0,1 μ M y EDTA 5 mM. Se determina la concentración de proteínas mediante el ensayo de proteína BioRad (BioRad DC Protein Assay kit n.º 500-0116) usando BSA como estándar. Se divide la proteína de forma proporcional y
5 se almacena a -80 °C.

Fase viva

Se cultivan las células EMT6-LM2 en el Medio modificado de Dulbecco de Isocove (MDM) suplementado con FBS al 10 %, Glutamax 2 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM y se incuban
10 a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se tratan con tripsina y se aíslan del cultivo. Se vuelve a suspender las células en la solución equilibrada de Hank (HBSS) y luego se mezclan con MATRIGEL® (1:1). Se implantan las células (5 x 10⁵/animal) de
15 forma subcutánea en el flanco posterior de los ratones (ratones BALB/c hembra, Harlan). Se mide el volumen del tumor con un calibre y el peso corporal dos veces por semana. Una vez que el volumen del tumor alcanza aproximadamente 200 a 250 mm³, se dividen los animales de forma aleatoria y se
20 crean grupos de control con vehículo y de tratamiento con el compuesto. Se administran el compuesto (formulado en hidroxietilcelulosa al 1 % (HEC) y TWEEN® 80 al 0,25 % y antiespumante al 0,05 %) y el control con vehículo (HEC al 1 % y TWEEN® 80 al 0,25 % y antiespumante al 0,05 %) mediante

sonda oral. Se genera una respuesta a la dosis al probar los compuestos en un único momento específico (2 horas) tras una dosis única de: 2,7, 8,3, 25, 75 o 150 mg/kg. Se evalúa la evolución temporal para la dosis TED_{50} o TED_{80} calculada
5 (método detallado a continuación) de un estudio de respuesta a la dosis mediante la eutanasia de los ratones en diferentes momentos entre 1 hora y 16 horas después de una única dosis.

Procesamiento de tejidos

10 Se cosechan los tejidos de tumores y se homogenizan según se describe a continuación. Se congelan los tejidos de los tumores (~100 mg cada uno) en nitrógeno líquido y se pulverizan con mortero. Se coloca el tejido pulverizado en un tubo (tubo de matriz A para lisis, MPBio n.º 6910-100) sobre
15 hielo seco y se homogeniza en un amortiguador de lisis (0,6 mL cada uno) (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) 1 mM, TRITON® X-100 al 1 %; cóctel inhibidor de proteasa (Sigma P8340), cóctel inhibidor de
20 fosfatasa II (Sigma P5726), cóctel inhibidor de fosfatasa III (Sigma P0044)) durante 25 segundos con un homogenizador Bio101 FASTPREP® FP120 (configuración 4,5). Se sedimentan las perlas y los fragmentos celulares mediante centrifugado a 14 000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfiere el lisado

a un nuevo tubo de microcentrifugado y se vuelve a centrifugar a 14 000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se transfiere el lisado centrifugado a una placa de 96 pocillos de pocillos profundos y se deja en hielo. Se determina la

5 concentración de proteínas para cada lisado mediante un ensayo de proteína BioRad (BioRad DC Protein Assay kit n.º 500-0116) como se indica a continuación. Se prepara el reactivo de trabajo mediante adición de un kit de reactivo S (20 µL) a cada 1 mL de kit de reactivo A que se necesita para

10 el ensayo. Se preparan 3 a 5 disoluciones de un estándar de proteína a partir de 0,2 mg/mL a 1,5 mg/mL de proteína y se genera una curva estándar. Se colocan 5µL de muestras y estándares con pipeta en una placa de microvaloración limpia y seca. Se agregan 25 µL de reactivo de trabajo a cada

15 pocillo. Se agregan 200 µL de reactivo B a cada pocillo y se agita durante 5 segundos. Después de 15 minutos, se determina la absorción de cada pocillo a 750 nM. Los niveles de proteínas para cada pocillo se determinan mediante comparación con la absorción de los pocillos de muestra

20 respecto a la curva estándar derivada de los pocillos estándar. Se normalizan los lisados de tumor a 10 mg/mL con amortiguador de lisis en preparación para el análisis de pSMAD2 y el SMAD2/3 total mediante ELISA según el método descrito a continuación.

ELISA SMAD

Los lisados de tumor se someten a ensayos usando placas de ELISA independientes donde una placa se usa para
5 determinar los niveles de SMAD 2/3 totales y la otra placa se utiliza para determinar los niveles de fosfo SMAD 2. Mientras que el anticuerpo de revestimiento es el mismo para ambas placas, el anticuerpo secundario es específico para SMAD 2/3 total o fosfo SMAD 2. Estas placas se denominan, de forma
10 colectiva, «placas ELISA» y de forma individual «placa ELISA total» o «placa fosfo ELISA», respectivamente. Se prepara el anticuerpo de revestimiento a 2,5 µg/mL en amortiguador de carbonato-bicarbonato BupH (anticuerpo monoclonal anti-SMAD 2/3, BD Biosciences n.º 610843; carbonato-bicarbonato BupH de
15 Pierce n.º 28382) y se agregan a 100 µL por pocillo a placas inmuno de 96 pocillos (Thermo Scientific n.º 439454) e incuban durante la noche a 4 °C en una plataforma agitadora para generar placas ELISA. Luego, se lavan las placas ELISA cuatro veces con el amortiguador de lavado (TWEEN® 20 al
20 0,5 % en salina tamponada con tris (TBS), pH 8,0 de Sigma n.º T-9039) y posteriormente se bloquea con 200 µL por pocillo de amortiguador de bloqueo (suero albúmina bovino (BSA) al 1 % en TBS diluido 1x) a temperatura ambiente en una plataforma agitadora durante dos horas. Se lava cuatro veces

con un amortiguador de lavado. Se agregan 100 µL por pocillo de lisado de tumor o lisado de vehículo a 10 mg/ml a la placa ELISA de fosfo SMAD en los pocillos apropiados. Se agregan 98 µL por pocillo de amortiguador de lisis y 2 µL por pocillo de 10 mg/ml de lisado de tumor o lisado de vehículo a la placa ELISA total en los pocillos apropiados (0,02 mg de proteína lisada final). También se agrega una curva estándar a cada placa ELISA (tanto fosfo como total) usando pSMAD2 purificada. Se incuba durante la noche. Se lavan las placas ELISA nuevamente cuatro veces con amortiguador de lavado. Se preparan anticuerpos secundarios (anticuerpo monoclonal de conejo anti fosfo SMAD2 de Millipore n.º 04-953; anticuerpo policlonal de conejo anti SMAD2/3 de Millipore n.º 07-408) con una dilución de 1:500 en amortiguador de lisis suplementado con BSA al 1 % y se agregan 100 µL por pocillo a la placa apropiada. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante dos a tres horas. Se lavan cuatro veces con amortiguador de lavado y se agregan a las placas 100 µL por pocillo de anticuerpo reportador (HRP anti conejo, GE Healthcare n.º NAV934V, diluido 1:10 000 en amortiguador de bloqueo). Las placas se incuban durante una hora a temperatura ambiente y se lavan unas últimas cuatro veces con amortiguador de lavado y se agregan 100 µL por pocillo de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina a temperatura ambiente (TMB;

Surmodics/BioFX n.º TMBW-0100-01). Se incuban las placas a 37°C durante hasta treinta minutos. Se detiene la reacción mediante la adición de 100 µL de solución de detención (H₂SO₄ 1N). Se determina la absorción (OD) a 450 nm en un lector de
5 placas.

Se usa la tasa de SMAD total (tSMAD) respecto a fosfo SMAD (pSMAD) para el grupo con vehículo para determinar la inhibición mínima (0 %) de señal de pSMAD. Se calcula el porcentaje de inhibición para los grupos tratados con el
10 compuesto en relación a la inhibición mínima de pSMAD para grupo con vehículo. Se calcula las TED₅₀ y TED₈₀ de un estudio de respuesta a la dosis (dosis necesaria para alcanzar 50 % y 80 % de inhibición en este momento específico, respectivamente) mediante el uso de un procedimiento NLIN en
15 SAS (Versión 9.3, Cary, NC). Este ensayo demuestra que el Ejemplo 1 tiene un valor de TED₅₀ de 10,8 mg/kg 2 horas después de 1 dosis y un TED₈₀ de 24,1 mg/kg. En el estudio de evolución temporal en la dosis TED₅₀ (11 pmk), el Ejemplo 1 presenta 48 % de inhibición tras una hora y 39 % de
20 inhibición tras dos horas posteriores a la administración de la dosis. En el estudio de evolución temporal a (25 mpk), el Ejemplo 1 presentó 71 % de inhibición tras una hora y 70 % de inhibición tras dos horas posteriores a la administración de la dosis.

Los compuestos de la presente invención son generalmente eficaces en un rango amplio de dosificación. Por ejemplo, las dosis por día suelen caer en el rango diario de alrededor de 1 a 2000 mg. Preferentemente, dichas dosis caen dentro del

5 rango diario de 10 a 1000 mg. Más preferentemente, dichas dosis caen dentro del rango diario de 10 a 100 mg. Aún más preferentemente, dichas dosis caen dentro del rango diario de 10 a 80 mg. Y aún más preferentemente, dichas dosis caen dentro del rango diario de 10 a 50 mg. En algunas instancias

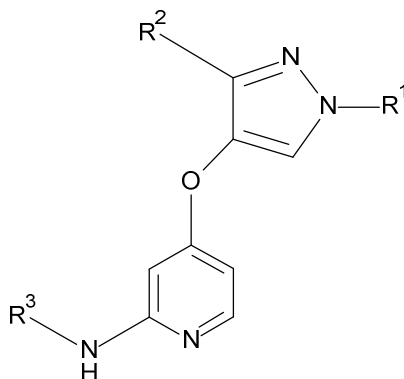
10 los niveles de dosificación por debajo del límite inferior de los rangos mencionados pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden utilizar dosis aún mayores y, por lo tanto, no se pretende que los rangos de dosificación anteriores limiten el alcance de la invención de modo alguno.

15 Ha de entenderse que la cantidad del compuesto administrado efectivamente será determinada por un médico, considerando las circunstancias pertinentes, incluyendo la afección que se trata, la vía de administración elegida, el o los compuesto/s reales que se administren, la edad, peso y respuesta del

20 paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente.

Reivindicaciones:

1. Un compuesto de la fórmula:



5 en el cual:

R^1 es hidrógeno, isopropilo, difluorometilo, difluoroetilo o ciclopentilo;

R^2 es etilo, terc-butilo, piridin-2-ilo, tetrahidropiran-4-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, ciclopropilo o

10 ciclobutilo; y

R^3 es carbamoilfenilo, piridin-2-ilo, (1-hidroxi-1-metiletil)piridinilo, 1-metil-2-oxo-1H-piridin-4-ilo, 1-metilpirazolilo, pirazin-2-ilo, 2-metoxipirimidin-4-ilo, 1-metil-2-oxo-1H-pirimidin-4-ilo, piridazin-3-ilo, 6-

15 cloropiridazin-3-ilo, 6-metilpiridazin-3-ilo, o 6-metoxipiridazin-3-ilo;

o una sal de ellos aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

2. El compuesto conforme a la reivindicación 1 que es
2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-
pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol
o una de sus sales aceptables desde el punto de vista
5 farmacéutico.

3. El compuesto o sal conforme a la reivindicación 1 o
2 que es 4-metilbencenosulfonato de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-
3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-
10 il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol.

4. El compuesto o sal conforme a cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 3 que es 4-metilbencenosulfonato de 2-
{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-
15 pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol
cristalino.

5. El compuesto o sal conforme a cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 4 que es 4-metilbencenosulfonato de 2-
20 {4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahydro-2H-piran-4-il)-1H-
pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol
cristalino y comprende al menos un pico en 17,8° en
combinación con uno o más de los picos que se seleccionan del
grupo que consiste en 19,7°, 18,4° y 22,0° ($2\theta \pm 0,2^\circ$).

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y uno o más excipientes, portadores o diluyentes
5 aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

7. Un método para tratar el cáncer en un paciente que precise dicho tratamiento y que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-
10 (tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

8. El método conforme a la reivindicación 7 en el cual
15 la sal es un 4-metilbencenosulfonato.

9. El método conforme a la reivindicación 7 u 8 en el cual el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer renal,
20 glioblastoma, cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico, cáncer de pulmón y cáncer gástrico.

10. Un método para tratar la fibrosis en un paciente que precise un tratamiento tal y que comprende administrar al

paciente una cantidad eficaz de 2-{4-[(4-{[1-ciclopropil-3-(tetrahidro-2H-piran-4-il)-1H-pirazol-4-il]oxi}piridin-2-il)amino]piridin-2-il}propan-2-ol o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

5

11. El método conforme a la reivindicación 10 en el cual la sal es un 4-metilbencenosulfonato.

12. El método conforme a la reivindicación 10 u 11 en
10 el cual la fibrosis se selecciona del grupo que consiste en fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.

13. Un compuesto o sal conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en terapia.

15

14. Un compuesto o sal conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de cáncer.

20

15. Un compuesto o sal para uso conforme a la reivindicación 14 en el cual el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer renal, glioblastoma, cáncer de

páncreas, síndrome mielodisplásico, cáncer de pulmón y cáncer gástrico.

16. Un compuesto o sal conforme a cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de fibrosis.

17. Un compuesto o sal para su uso conforme a la
reivindicación 16 en el que la fibrosis se selecciona del
10 grupo que consiste en fibrosis hepática y enfermedad renal crónica

RESUMEN

La presente invención se refiere a compuestos novedosos de aminopiridiloxipirazol que inhiben la actividad del receptor 1 del factor del crecimiento transformante beta (TGF β R1), composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y métodos para utilizar los compuestos para tratar cáncer, preferentemente cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer renal, glioblastoma, cáncer de páncreas, síndrome mielodisplásico, cáncer de pulmón y cáncer gástrico y/o fibrosis, preferentemente fibrosis hepática y enfermedad renal crónica.