

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 387**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**C07D 471/12** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13712005 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2850082**

54 Título: **1-(3,3-Dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido(2,3-d)pirimidin-6-il)fenil)urea como inhibidor de Raf quinasa para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**07.03.2012 US 201261607702 P**

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

**27.09.2016**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (50.0%)**  
**Lilly Corporate Center**  
**Indianapolis, IN 46285, US y**  
**DECIPHERA PHARMACEUTICALS, LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALLGEIER, MATTHEW CARL;**  
**FLYNN, DANIEL L.;**  
**KAUFMAN, MICHAEL D.;**  
**PATEL, PHENIL J. y**  
**WOLFANGEL, CRAIG D.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 584 387 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

1-(3,3-Dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido(2,3-d)pirimidin-6-il)fenil)urea como inhibidor de Raf quinasa para el tratamiento del cáncer

5 La cascada de señalización de proteína quinasa quinasa, activada por Ras/Raf/mitógeno (también conocida como MAP2K; MAPK quinasa; y MAPK/ERK quinasa o MEK/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (mencionada en el presente documento como "Ras/Raf/MEK/ERK" o "Ras/Raf/MEK/MAPK") es una ruta evolutivamente conservada que desempeña un papel integral en el desarrollo y homeostasis de tejidos en mamíferos. Esta ruta de señalización consiste en una cascada de quinasas que transmite señales extracelulares al núcleo para regular la expresión génica y funciones celulares clave. La expresión génica controlada por la ruta de señalización Ras/Raf/MEK/ERK regula los procesos celulares fundamentales que incluyen proliferación, diferenciación, apoptosis, y angiogénesis. Estos papeles diversos de la señalización de Ras/Raf/MEK/ERK se activan de forma aberrante en diversos tipos de cáncer. Mutaciones en genes dentro de esta ruta pueden conducir a proteínas constitutivamente activas provocando proliferación celular aumentada, y resistencia a apoptosis.

15 Raf (una serina/treonina-proteína quinasa) está codificada por una familia de genes que consiste en tres genes que producen tres miembros de isoforma de Raf (B-Raf, C-Raf (Raf-1) y A-Raf). Cada una de estas proteínas comparte regiones reguladoras aminoterminales muy conservadas y dominios catalíticos en el extremo carboxi. Salvo que se indique de otro modo, Raf se refiere a los tres miembros. Aunque cada isoforma desempeña un papel en la ruta Ras/Raf/MEK/ERK, B-Raf ha demostrado ser el activador principal de MEK. B-Raf se recluta por Ras:GTP a la membrana celular intracelular donde B-Raf se vuelve activo. A su vez, B-Raf es responsable de la activación de MEK1/2 y MEK1/2 activa ERK1/ERK2. Mutaciones en el gen de B-Raf permiten que B-Raf señalice independientemente de señales corriente arriba. Como resultado, la proteína B-Raf mutada (tal como V600E) causa señalización excesiva corriente abajo de MEK y ERK. Esto conduce a proliferación celular excesiva y supervivencia y oncogénesis. La sobreactivación de la cascada de señalización por B-Raf mutada se ha implicado en múltiples neoplasias.

25 El receptor tirosina quinasa (RTK) c-KIT (también llamado CD 117), se expresa en una amplia diversidad de tipos celulares. El ligando para c-KIT es el factor de células madre (SCF). La unión de SCF al dominio extracelular de c-KIT induce dimerización del receptor y activación de rutas de señalización corriente abajo, incluyendo la ruta RAS/RAF/MEK/ERK. c-KIT mutante se ha implicado en la patogénesis de varios cánceres.

30 A pesar de inhibidores específicos de B-Raf (tales como vemurafenib), y de compuestos tales como los desvelados en los documentos WO 2006/039718 y WO 2008/034008, existe la necesidad de un inhibidor de Raf activo en la inhibición de todas las isoformas de proteínas Raf, incluyendo A-Raf, B-Raf, C-Raf, y la mutación V600E de B-Raf. Existe una necesidad adicional de un inhibidor de Raf que sea activo contra células tumorales con activación de ruta corriente arriba por mutaciones de N-Ras, mutaciones de K-Ras y mutaciones de cKit. Además, sigue existiendo la necesidad de proporcionar inhibidores alternativos de Raf para el tratamiento del cáncer. También sigue existiendo una necesidad de proporcionar inhibidores alternativos de Raf activos en la inhibición de A-Raf, B-Raf, C-Raf, y la mutación V600E de B-Raf para el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona un inhibidor de Raf que pueda ser activo en la inhibición de todas las isoformas de proteínas Raf. Además, la presente invención proporciona un inhibidor de Raf que puede ser activo contra células tumorales con activación de la ruta corriente arriba por mutaciones de N-Ras, mutaciones de K-Ras, y mutaciones de cKit. Adicionalmente, la presente invención proporciona un inhibidor alternativo de Raf. Además, la presente invención proporciona un inhibidor alternativo de Raf que puede ser útil para tratar el cáncer. La presente invención también proporciona un inhibidor alternativo de Raf activo en la inhibición de A-Raf, B-Raf, C-Raf, y la mutación V600E de B-Raf. Además, la presente invención proporciona un inhibidor alternativo de Raf activo en la inhibición de A-Raf, B-Raf, C-Raf, y la mutación V600E de B-Raf que puede ser útil para tratar el cáncer.

45 La Figura 1 es un patrón representativo de difracción en polvo de rayos-X para el Ejemplo 1.

La presente invención proporciona un compuesto que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como una realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea.

50 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-

d]pirimidin-6-il)fenil)urea, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como una realización particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (PVP-VA). La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, y polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (PVP-VA). Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de las composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento, en las que PVP-VA se selecciona entre el grupo que consiste en Kollidon® VA 64 y Plasdone™ S-630 copovidona. Preferiblemente, el PVP-VA es Kollidon® VA 64.

Una formulación actualmente preferida comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con Kollidon® VA 64 (BASF Corporation Producto n.º 95405-2-43), un copolímero de 1-vinil-2-pirrolidona y acetato de vinilo en una relación de 60:40 y lauril sulfato sódico al 1-2 % (p/p). Se prepara una dispersión sólida que puede comprender una carga de fármaco del 20 % o el 40 % y puede incluir lauril sulfato sódico al 0-2 % o una cantidad apropiada de otro agente humectante farmacéuticamente aceptable adecuado, un plastificado, un auxiliar de procesamiento u otro excipiente o excipientes adecuados.

La presente invención desvela un procedimiento para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La presente invención proporciona un procedimiento para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea.

La presente invención proporciona 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en terapia. La presente invención proporciona 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de cáncer. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer, comprendiendo la composición farmacéutica 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención proporciona 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea para su uso en terapia. La presente invención proporciona 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea para su uso en el tratamiento de cáncer. La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer, comprendiendo la composición farmacéutica 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea.

La presente invención proporciona el uso de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. La presente invención también proporciona el uso de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

La presente invención proporciona 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea en forma cristalina. La presente invención también proporciona 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea en forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos X que tiene picos característicos, en  $2\theta \pm 0,2$ , que aparecen en 16,0 y uno o más de 6,9, 7,0, 18,2 y 23,2.

Además, la presente invención desvela realizaciones preferidas de los procedimientos y usos como se describe en el presente documento, en que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda (AML, leucemia mielóide aguda), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica crónica (CLL), síndrome mielodisplásico, cáncer de ovario, melanoma, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer hepático o cáncer de tiroides. Más preferentemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de tiroides, cáncer de ovario, melanoma, leucemia mielógena aguda (AML, leucemia mielóide aguda), y cáncer colorrectal. Incluso más preferentemente, el cáncer es melanoma o cáncer colorrectal.

La presente invención desvela un procedimiento de tratamiento de un cáncer que es cáncer de tiroides, cáncer de ovario, melanoma, AML o cáncer colorrectal en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Un compuesto que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en terapia.

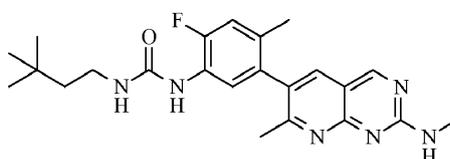
Un compuesto que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de un cáncer que es cáncer de tiroides, cáncer de ovario, melanoma, ELA o cáncer colorrectal.

5 Uso de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que es cáncer de tiroides, cáncer de ovario, melanoma, ELA o cáncer colorrectal.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende, 1-(3,3-dimetilbutil)-3-{2-fluoro-4-metil-5-[7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il]fenil}urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

10 En una realización particular, la composición farmacéutica comprende 1-(3,3-dimetilbutil)-3-{2-fluoro-4-metil-5-[7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il]fenil}urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos particularmente para el tratamiento de cáncer generalmente o un tipo de cáncer específico.

La presente invención proporciona un compuesto de la fórmula:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término "paciente" significa mamífero y "mamífero" incluye, aunque sin limitación un ser humano.

20 "Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significan la dosificación del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o composición farmacéutica que contiene el compuesto ejemplificado, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, necesaria para inhibir la señalización de B-Raf, C-Raf, A-Raf y/o B-Raf V600E en un paciente con cáncer, y destruir las células cancerosas diana o ralentizar o detener la progresión del cáncer en un paciente. Las dosificaciones anticipadas del compuesto ejemplificado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, están en el intervalo de 300 a 1500 mg/paciente/día. Se anticipa que dosificaciones preferidas están en el intervalo de 400 a 1400 mg/paciente/día. Se anticipa que dosificaciones mucho más preferidas están en el intervalo de 600 a 1200 mg/paciente/día. La dosificación exacta necesaria para tratar a un paciente y la duración del tiempo de tratamiento se determinarán por un médico en vista de la fase y gravedad de la enfermedad, así como las necesidades específicas y respuesta del paciente individual y el compuesto particular administrado. Aunque se expresa como dosificación en una base por día, el régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar un beneficio terapéutico más óptimo a un paciente. Además de la dosificación diaria, puede ser apropiada dosificación dos veces al día (BID) o tres veces al día (TID). La dosificación BID es actualmente preferida.

30

Los términos "tratamiento", "tratar", y "que trata", se entiende que incluyen el espectro completo de intervención para el cáncer que está padeciendo el paciente, tal como administración del compuesto activo para aliviar, ralentizar o revertir uno o más de los síntomas del cáncer y retardar la progresión del cáncer incluso si el cáncer no está realmente eliminado.

35 El compuesto ejemplificado de la presente invención se formula preferentemente como una composición farmacéutica usando un vehículo farmacéuticamente aceptable o usando uno o más vehículos, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables y se administra por una diversidad de vías. Preferentemente, dichas composiciones son para administración oral. Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, y col., eds., 21ª ed., Mack Publishing Co., 2005).

40

El compuesto ilustrado de la presente invención es capaz de reaccionar con varios ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables. Dichas sales farmacéuticamente aceptables y metodología común para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, y col., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, y col., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, n.º 1, enero de 1977.

45

Ha de entenderse que 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, puede prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, así como los descritos a continuación.

50 El Ejemplo 1 se denomina: 1-(3,3-dimetilbutil)-3-{2-fluoro-4-metil-5-[7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il]fenil}urea; y también puede denominarse: N-(3,3-dimetilbutil)-N'-[2-fluoro-4-metil-5-[7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il]fenil]urea; y pueden usarse otros nombres para identificar inequívocamente el

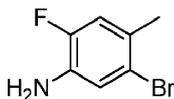
**Ejemplo 1.**

Los compuestos empleados como materiales de partida iniciales en la síntesis de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea se conocen bien y, en la medida en que no están disponibles en el mercado, se sintetizan fácilmente usando las referencias específicas proporcionadas, por procedimientos estándar empleados comúnmente por los expertos en la técnica, o se encuentran en textos de referencia generales.

Los ejemplos de procedimientos y métodos conocidos incluyen los descritos en los textos de referencia generales, tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volúmenes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5ª Edición, Michael B. Smith y Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4ª Edición, Parte B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey y Richard J. Sundberg, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, etc., y referencias citadas en ese documento.

Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: "d6-DMSO" se refiere a hexadeutero-dimetilsulfóxido; "DCM" se refiere a diclorometano; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "IPAC" se refiere a acetato de isopropilo; "KF" se refiere a Karl Fischer; "EM" se refiere a espectroscopía de masas; "MeOH" se refiere a metanol; "MTBE" se refiere a terc-butil metil éter; "RMN" se refiere a resonancia magnética nuclear; "TA" se refiere a temperatura ambiente; "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

A menos que se indique otra cosa, los compuestos ilustrados en el presente documento se nombran y se numeran usando ACDLABS o Symyx Draw 3.2.

**Preparación 1****5-Bromo-2-fluoro-4-metilanilina****Procedimiento A:**

Combinar 1-bromo-4-fluoro-2-metilbenceno (30,0 g, 159 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (100 ml), enfriar a aproximadamente -5 °C, y tratar gota a gota con ácido nítrico (11,00 ml, 174 mmol) durante 20 minutos. Dejar calentar la mezcla de reacción a TA y agitar durante 30 min. Verter sobre hielo picado con agitación y repartir con terc-butil metil éter (MTBE) (200 ml). Separar la fase acuosa y extraer con MTBE (2 x 50 ml). Combinar las fases orgánicas, secar y concentrar a presión reducida, proporcionando 1-bromo-4-fluoro-2-metil-5-nitrobenceno en forma de un aceite viscoso de color naranja (39,0 g).

Combinar 1-bromo-4-fluoro-2-metil-5-nitrobenceno en bruto (32,4 g, 138 mmol), etanol (100 ml) y Níquel Raney (1,00 g, 17,04 mmol) en un matraz agitador. Cargar el matraz con hidrógeno (275 kPa) y agitar hasta que se detenga la absorción de hidrógeno. Despresurizar el recipiente de reacción, eliminar el catalizador por filtración, y evaporar el filtrado a sequedad. Añadir MTBE, después filtrar de nuevo y evaporar el filtrado. Agitar el residuo en hexanos. Recoger los sólidos por filtración, lavar con hexanos fríos y secar al vacío, proporcionando el compuesto del título (17,8 g, rendimiento del 63 %) en forma de un sólido de color oscuro. EM (m/z): 204,0 (M+1)/206,0 (M+3).

**Procedimiento B:**

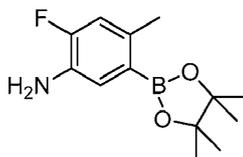
En un matraz de fondo redondo de 4 bocas equipado con agitación mecánica, un termómetro, un baño de hielo y entrada de N<sub>2</sub> se le añade 1-bromo-4-fluoro-2-metilbenceno (1,4 kg, 7,4 mol), después se añade H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (6,3 kg) a 0-10 °C. Después de agitar durante 10-20 minutos, la mezcla se enfría a -10~0 °C, y se añade en porciones KNO<sub>3</sub> (0,82 kg, 7,8 mol, 1,05 equiv.) en aproximadamente 6 horas mientras se mantiene la temperatura a -10~0 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se calienta a 10-20 °C, y se controla por TLC (AE:PE = 1:20) y HPLC hasta que el contenido de 1-bromo-4-fluoro-2-metilbenceno es <0,5 %. La mezcla se vierte en una mezcla de hielo/agua (11,2 kg, Hielo:agua = 1:1) y se extrae dos veces con MTBE (4,7 l y 1,9 l). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con salmuera saturada (5,6 kg) y se concentran a 1,5~2 V por debajo de 45 °C a presión reducida. El residuo se diluye con EtOAc (5,6 l) y la solución resultante se usa directamente en la siguiente etapa (1,22 kg (% en peso corregido), rendimiento del 70,5 %, y 68,3 % de pureza detectada por absorción UV a 210 nm). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,35 (s, J = 7,1 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 11,3 Hz, 1H), 2,59 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

En un matraz de fondo redondo de 4 bocas equipado con agitación mecánica, un termómetro y entrada de N<sub>2</sub> se añade una solución de 1-bromo-4-fluoro-2-metil-5-nitrobenceno (1,16 kg, 4,96 mol) en EtOAc (5 l) y una solución al 36 % de HCl (4,9 kg, 49,6 mol, 10,0 equiv.). Después de agitar durante 5~10 minutos a 20~30 °C, se añade en porciones polvo de Fe (1,34 kg, 24,0 mol, 4,8 equiv.) mientras se mantiene la temperatura a 20-30 °C. La reacción se controla por TLC (AE:PE = 1:10). Después de la finalización de la reacción, el valor de pH se ajusta a 2~3 usando

NaHCO<sub>3</sub> y se añade Celite® (0,56 kg). La mezcla se agita durante 0,5~1 hora y se filtra. El sólido se lava con tolueno (2 x 2,6 l). Los filtrados se combinan y se agitan durante 0,5~1 h más antes de la separación de las fases. La fase acuosa se extrae con tolueno (2,6 l). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con salmuera (3 l) y se filtran a través de un lecho de gel de sílice (2~3 cm). El filtrado se concentra a 2~2,5 l y el residuo se mezcla con n-Heptano (3,3 l). Después del concentrado de nuevo a 2~2,5 l, se añade n-heptano (1,65 l). La mezcla se enfría a -10~-0 °C y se agita durante 1 hora. El precipitado se recoge por filtración, se lava con n-heptano (0,5 l, enfriado previamente a -10~-0 °C) y se seca, proporcionando el producto en bruto del compuesto del título en forma de un sólido de color pardo. La recristalización del producto en bruto con n-Heptano (3,3 l) proporciona un sólido de color blanquecino a pardo del compuesto del título. (527 g, rendimiento del 52 % y 98 % de pureza detectada por absorción UV a 210 nm). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d6-DMSO): δ 6,97 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 2,16 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 21,41, 116,60, 118,30, 119,66, 127,22, 132,88, (149,37, 151,12); RMN <sup>19</sup>F (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 151,14

## Preparación 2

### 2-Fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina



#### 15 Procedimiento A:

Combinar 5-bromo-2-fluoro-4-metil-anilina (3,1 g, 15,2 mmol), bis(pinacolato)diboro (4,24 g, 16,7 mmol) y acetato potásico (4,47 g, 45,6 mmol) en dioxano (40 ml) y rociar con argón. Añadir complejo de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II)-diclorometano (0,620 g, 0,760 mmol), rociar de nuevo con argón y calentar a 100 °C durante una noche. Filtrar la mezcla de reacción y concentrar al vacío. Purificar por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 0-50 %/hexanos) para dar el compuesto del título (3,24 g, rendimiento del 85 %). EM (m/z): 252,1 (M+1).

#### Procedimiento B:

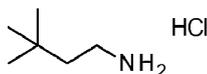
En un matraz de fondo redondo de 4 bocas equipado con agitación mecánica, un termómetro y entrada de N<sub>2</sub> se añaden 5-bromo-2-fluoro-4-metil-anilina (200 g, 0,98 mol), CH<sub>3</sub>COOK (192 g, 1,95 mol, 2,0 equiv.), bis(pinacolato)diboro (248 g, 0,98 mol, 1,0 equiv.) e IPAC (3 l). Después de desgasificar con N<sub>2</sub> durante 30 min, la mezcla se calienta a 50 °C y se añade Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (8 g, 4 % en peso). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante al menos 10 h hasta que el contenido de material de partida es ≤2 % (CG). La mezcla se enfría a 20~30 °C, se filtra a través de una capa de Celite® y se aclara con IPAC (1 l). El filtrado se concentra hasta que quedan 400~500 ml. El residuo se mezcla con n-Heptano (700 ml), se filtra a través de un lecho de SiO<sub>2</sub> y se eluye con IPAC/n-Heptano (1/5 en primer lugar, ~2 l, y después 2/5, ~3 l). El filtrado se concentra a 350~400 ml. Se añade n-Heptano (300 ml) y la mezcla se concentra de nuevo a 350~400 ml. El residuo (suspensión) se enfría a -10~-20 °C y se filtra después de agitar durante 2-5 h. El producto en bruto se disuelve en MeOH (200 ml) a 30~40 °C y después se añade lentamente gota a gota H<sub>2</sub>O (600 ml) en 0,5~1 h. La suspensión se enfría a 20~30 °C y se filtra de nuevo después de agitar durante 1-2 h. El sólido se seca a alto vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (183 g, rendimiento del 74 % y 99 % de pureza detectada por absorción UV a 210 nm; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,42 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 7,01 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 3,76 (s, 2H), 2,64 (s, 3H), 1,55 (s, 12H); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 20,66, 20,67, 24,40, 82,93, 116,20, 124,37, 130,64, 135,02, (151,93, 153,37); RMN <sup>19</sup>F (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 145,72

## Preparación 3

### 40 2-Fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenilcarbamato de prop-1-en-2-ilo



Añadir 2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (5,0 g, 19,91 mmol) y cloroformiato de isopropenilo (2,40 ml, 21,90 mmol) en EtOAc (60 ml) y NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (60 ml) y agitar a TA durante 6 h. Separar las fases, extraer la fase acuosa con EtOAc (2 x), lavar los productos orgánicos combinados con salmuera, secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrar, obteniendo el compuesto del título. Usar para la siguiente reacción sin purificación adicional (suponiendo un rendimiento del 100 %). EM (m/z): 336,2 (M+1).

**Preparación 4****Clorhidrato de 3,3-dimetilbutan-1-amina**

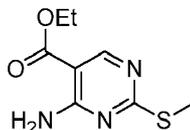
- 5 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas equipado con agitación mecánica, un termómetro y entrada de N<sub>2</sub> se añade 3,3-dimetilbutanal (200 g, 2,0 mol). Después, se añade gota a gota 1-fenilmetanamina (214 g, 2,0 mol, 1,0 equiv.). La mezcla de reacción se agita a 20~30 °C durante 2~5 horas hasta una conversión mayor del 99 % por CG. Se añade NaCl (4 g) y la fase acuosa se desecha. Se añade THF (800 ml) y la mezcla se concentra a 400 ml. Esta operación se repite hasta que el KF del residuo es menor del 0,2 %. Se añaden THF (800 ml) y t-BuOK (44,8 g, 0,4 mol, 0,2 equiv.).
- 10 La mezcla se calienta a 60~65 °C y se agita hasta que el contenido de N-bencil-3,3-dimetilbutan-1-imina es menor del 1 % por CG. Después de enfriar a 10-20 °C, se añade agua (1500 ml) y la mezcla se extrae con MTBE (2 x 1500 ml). La fase orgánica combinada se lava con NaCl saturado (800 ml), se muestra para comprobar para el análisis del contenido de agua y se asegura un contenido de KF del 1 %-2 %. La corriente de N-(3,3-dimetilbutil)-1-fenil-metanimina se usa directamente en la siguiente etapa. (83 % de pureza por CG; CG-EM m/z 188,2 [M-H]<sup>+</sup>).
- 15 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas equipado con agitación mecánica, un termómetro y entrada de N<sub>2</sub> se añade una solución de N-(3,3-dimetilbutil)-1-fenil-metanimina que se ha obtenido anteriormente (412 g, 2,18 mol, 3,27 l de MTBE 1,3 l de THF) y se añade gota a gota una solución de HCl/MTBE (16 %, 398 g, 1,74 mol, 0,8 equiv.) a 20~30 °C. Precipitó un sólido de color blanco durante la adición. Después de agitar durante 1~2 h, una muestra de alícuotas de la suspensión se filtró. Las aguas madre se comprueban por CG. Si el contenido de N-(3,3-dimetilbutil)-1-fenil-metanimina es mayor del 30 %, se añade una solución de HCl/MTBE adicional (45 g, 0,10 equiv.) hasta que el contenido de N-(3,3-dimetilbutil)-1-fenil-metanimina está entre el 20 %-30 % por CG. El sólido se recoge por filtración, se lava con MTBE (870 ml) y se seca en una atmósfera de N<sub>2</sub> para dar el compuesto del título deseado en forma de un material cristalino de color blanco (195 g, rendimiento del 65 %; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d6-DMSO): δ 7,90 (s, 3H), 2,74 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 0,89 (s, 9H); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, d6-DMSO): δ 28,98, 29,31, 35,49, 40,34.

**Preparación 5****1-(3,3-Dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)urea****Procedimiento A:**

- 30 Tratar una solución de 2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenilcarbamato de prop-1-en-2-ilo (6,67 g, 19,90 mmol) en dioxano (60 ml) con 3,3-dimetilbutan-1-amina (2,42 g, 23,9 mmol) y 1-metilpirrolidina (0,169 g, 1,99 mmol) y calentar a 75 °C durante una noche. Enfriar la mezcla a TA, recoger el sólido por filtración y lavar con éter dietílico, obteniendo el compuesto del título (6,62 g, rendimiento del 88 % en dos etapas). EM (m/z): 379,2 (M+1).

**Procedimiento B:**

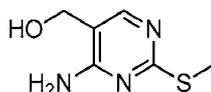
- 35 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas equipado con agitación mecánica, un termómetro y entrada de N<sub>2</sub> se añaden 2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (40 g, 0,159 mol), THF (600 ml) y NaHCO<sub>3</sub> (16,0 g, 0,19 mol, 1,20 equiv.). La mezcla se enfría a 0~5 °C y se añade gota a gota clorofornio de fenilo (26,14 g, 0,167 mol, 1,05 equiv.). La mezcla de reacción se calienta a 60 °C y se agita hasta que el contenido de 2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina es ≤2 %. La mezcla se filtra y el sólido (sal) se lava con THF (120 ml). El filtrado se concentra a 65~80 ml. Al residuo se le añaden tolueno (720 ml), 3,3-dimetilbutan-1-amina (sal HCl, 26,14 g, 0,19 mol, 1,2 equiv.) y TEA (20,87 g, 0,21 mol, 1,3 equiv.). La mezcla resultante se calienta a 90 °C y se agita hasta que el contenido de intermedio es ≤2 %. La mezcla se enfría a 15~20 °C, se agita durante 2 h y se filtra. El sólido se lava con tolueno (120 ml), H<sub>2</sub>O (2 x 400 ml) y se seca a alto vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. (54,9 g, rendimiento del 91,3 % y 99 % de pureza detectada por absorción UV a 210 nm); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, d6-DMSO): δ 8,34 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 8,08 (s, 1H), 6,98 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 6,41 (s, 1H), 3,08 (s, 2H), 2,38 (s, 3H), 1,36 (m, 14H), 0,90 (s, 9H); RMN <sup>13</sup>C (500 MHz, d6-DMSO): δ 21,12, 24,65, 29,37, 29,58, 35,65, 43,50, 83,25, 104,32, 116,09, 125,02, 128,19, 138,71, (152,40, 154,34), 154,81; RMN <sup>19</sup>F (400 MHz, d6-DMSO): δ 136,34

**Preparación 6****4-Amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carboxilato de etilo****Procedimiento A:**

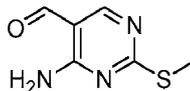
- 5 Añadir hidróxido de amonio concentrado (335 ml, 8,60 mol) a una suspensión agitada vigorosamente de 4-cloro-2-(metiltio)pirimidin-5-carboxilato de etilo (200 g, 860 mmol) en etanol (EtOH) (450 ml) y permitir la agitación durante una noche. Recoger los sólidos por filtración, aclarar con EtOH (2 x 100 ml) y H<sub>2</sub>O (3 x 200 ml) y secar en una estufa de vacío (65-70 °C) durante una noche, proporcionando el compuesto del título (164,4 g, rendimiento del 90 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m/z): 214,1 (M+1).

**10 Procedimiento B:**

- Cargar el recipiente de reacción con 1190 g de THF y 660 g de 4-cloro-2-(metilsulfanil)pirimidin-5-carboxilato de etilo (1,0 equiv. 2,84 mol). Agitar a 10~20 °C durante 20-30 min, y después añadir 907 g de NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O y 989 g de Et<sub>3</sub>N a la mezcla. Calentar a 45-55 °C, y agitar durante 2-6 h a 45-55 °C. Después de la finalización de la reacción, enfriar a 8-12 °C y añadir 4000 g de agua. Agitar durante 4-8 h a 8-12 °C, filtrar y aclarar con 200 g de agua. Secar la torta al vacío a 80 °C durante 8-24 h, obteniendo el compuesto del título (560 g; 98,8 % de pureza con un rendimiento del 92 %; [M+1] = 213,8, RMN <sup>1</sup>H (d6-DMSO, 400 MHz): δ = 8,564 (s, 1H), 8,278 (s, 1H), 8,011 (s, 1H), 7,649 (s, 1H), 4,293-4,240 (dd, J<sub>1</sub> = 6,8, J<sub>2</sub> = 14, 2H), 2,462 (s, 3H), δ 1,308-1,272 (m, 3H)).

**Preparación 7****4-Amino-2-(metiltio)pirimidin-5-il)metanol**

- 20 Enfriar una solución de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carboxilato de etilo (72,3 g, 339 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (900 ml) a 0 °C. Añadir gota a gota una solución de LiAlH<sub>4</sub> (2 M en THF) (195 ml, 390 mmol) durante 1 h. Agitar durante 2 h a 0 °C y dejar que la reacción alcance a TA durante una noche. Enfriar la mezcla a 0 °C e inactivar cuidadosamente por la adición secuencial de agua (15 ml), KOH ac. al 20 % (15 ml) y agua (30 ml). Agitar la mezcla resultante durante 1 h. Secar sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrar, concentrar a presión reducida y secar al vacío, obteniendo el compuesto del título (55,85 g, rendimiento del 96 %). EM (m/z): 172,1 (M+1).

**Preparación 8 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carbaldehído****Procedimiento A:**

- 30 Añadir MnO<sub>2</sub> (49,8 g, 572 mmol) a una suspensión de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-il)metanol (28 g, 164 mmol) en cloroformo (818 ml) y calentar la reacción a 55 °C (medir internamente) durante 4 h. Filtrar la mezcla de reacción caliente y aclarar la torta de filtro con cloroformo caliente y THF. Concentrar los filtrados combinados a presión reducida y secar al vacío, proporcionando el compuesto del título (26,7 g, rendimiento del 96 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido EM (m/z): 170,1 (M+1).

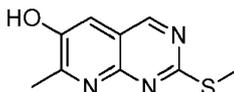
**35 Procedimiento B:**

- Cargar un recipiente de reacción con 450 g (2,08 mol, 1,0 equiv.) de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carboxilato de etilo y 6750 ml (15,0 V) de THF. En un recipiente de reacción separado, cargar 88,1 g (1,1 equiv.) de LiAlH<sub>4</sub> y 2250 g (5,0 V) de THF. Enfriar esta mezcla de LiAlH<sub>4</sub> a -5~5 °C. Añadir gota a gota la solución en THF de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carboxilato de etilo a la mezcla de LiAlH<sub>4</sub> por debajo de 10 °C. Después de la adición, agitar la mezcla a 5~15 °C durante 2~3 horas. Enfriar a -5~5 °C y añadir gota a gota 279 g (1,5 equiv.) de EtOAc por debajo de 20 °C. Agitar la mezcla a 10~20 °C durante 1~2 horas. Añadir en porciones 450 g (0,66 equiv.) de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·110H<sub>2</sub>O por debajo de 20 °C. Agitar la mezcla a 10~20 °C durante 1~2 horas. Filtrar la suspensión a través de tierra de diatomeas. Lavar la torta con THF. Cargar 734 g (4,0 equiv.) de MnO<sub>2</sub> en el filtrado que contiene una solución de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-il)metanol. Calentar la mezcla a 40 °C. Agitar la mezcla a 40~45 °C

durante 6~8 horas. Filtrar la suspensión a través de tierra de diatomeas. Lavar la torta con THF. Combinar el filtrado, concentrar y añadir gota a gota 1530 g (5,0 V) de n-Heptano. Agitar la mezcla a 10~20 °C durante 3~4 horas. Filtrar la suspensión y lavar la torta con heptano. Secar la torta de filtro a presión reducida a 40~50 °C durante 10-16 h, proporcionando el compuesto del título (276 g; 97,9 % de pureza con un rendimiento del 75 %; [M+1] = 171,8, RMN <sup>1</sup>H (d6-DMSO, 400 MHz): δ = 7,887 (s, 1H), 6,704 (s, 2H), 5,066-5,042 (m, 1H), δ 4,292-4,280 (d, 2H), 2,392 (s, 3H); [M+1] = 169,8, RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 9,769 (s, 1H), 8,414 (s, 1H), 8,190 (s, 1H), 5,772 (s, 1H), 2,540 (s, 3H)).

## Preparación 9

### 7-Metil-2-(metiltio)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ol



#### Procedimiento A:

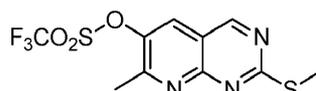
Añadir 1-hidroxiopropan-2-ona (24,3 ml, 355 mmol) y 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carbaldehído (50 g, 296 mmol) a una solución de hidróxido sódico (23,64 g, 591 mmol) y agua (200 ml). Añadir EtOH (600 ml) a la suspensión y agitar a TA durante una noche. Añadir lentamente una solución de HCl concentrado (50 ml) en agua (350 ml). Añadir 1:1 de EtOH/H<sub>2</sub>O (100 ml) y recoger los sólidos por filtración. Lavar los sólidos con 1:1 de EtOH/H<sub>2</sub>O (250 ml), EtOH enfriado con hielo (4 x 25 ml) y hexanos (2 x 250 ml). Secar en la estufa de vacío a 30-35 °C, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color castaño (34 g, rendimiento del 56 %). EM (m/z): 208,1 (M+1).

#### Procedimiento B:

Cargar el recipiente de reacción con 2400 g (8,0 V) de H<sub>2</sub>O y 177,3 g (2,5 equiv.) de NaOH y 300,0 g (1,77 mol, 1,0 equiv.) de 4-amino-2-(metiltio)pirimidin-5-carbaldehído y 157,6 g (1,2 equiv.) de hidroxiacetona. Calentar la mezcla a 35-45 °C y agitar durante 10-20 h a 35-45 °C. Enfriar la mezcla a 5-15 °C. Añadir gota a gota 4500 ml de HCl 1 N y ajustar el pH a 3~4 por debajo de 15 °C. Agitar durante 1-2 h a 10-15 °C. Filtrar y aclarar la torta con 300 g de agua. Secar la torta de filtro a presión reducida a 50~60 °C durante 16-24 h, proporcionando el compuesto del título (372 g de un sólido de color pardo; área de HPLC al 98,0 % (ensayo: 90,0 %); rendimiento del 90 %; RMN <sup>1</sup>H (d6-DMSO, 400 MHz): δ = 10,864 (s, 1H), 9,276 (s, 1H), 7,529 (s, 1H), 2,570 (s, 6 H)).

## Preparación 10

### Trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metiltio)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo

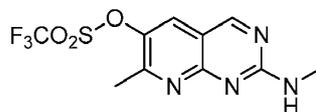


#### Procedimiento A:

Combinar 7-metil-2-(metiltio)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ol (25 g, 121 mmol), DCM (1100 ml) y piridina (98 ml, 1206 mmol) y enfriar la mezcla con un baño de hielo hasta la temperatura interna <3 °C. Añadir lentamente trifluorometanosulfónico anhídrido (24,5 ml, 145 mmol) mediante una jeringa a tal velocidad que la temperatura interna se mantenga por debajo de 5 °C. Agitar la mezcla de reacción a 0 °C durante 2 h. Lavar con agua (3 x 300 ml) y salmuera (300 ml), secar sobre MgSO<sub>4</sub> y filtrar. Concentrar el filtrado a presión reducida (temp. baño de agua ~ 35 °C) y secar a alto vacío durante 2-3 h a TA. Disolver el residuo en DCM y purificar por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc/hexanos). Concentrar las fracciones, proporcionando un sólido semi-puro. Triturar el sólido con EtOAc al 20 %/hexanos (100 ml), recoger por filtración, aclarar con EtOAc al 20 %/hexanos (2 x 10 ml) y secar al vacío a TA, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color rosa pálido (28,6 g, rendimiento del 70 %). EM (m/z): 340,0 (M+1).

#### Procedimiento B:

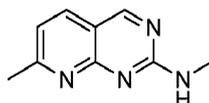
Cargar el recipiente de reacción con 4000 ml (20,0 V) de DCM y 208 g (1,0 mol, 1,0 equiv.) de 7-metil-2-(metiltio)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ol. Agitar la mezcla durante 10-20 min. Cargar 312 g (4,0 equiv.) de piridina por debajo de 20 °C. Enfriar a -5~0 °C y añadir gota a gota la solución de 416 g de Trifluorometanosulfónico anhídrido (1,5 equiv.) en DCM (2000 ml, 10,0 V) por debajo de 0 °C. Después de la adición, agitar a 0-5 °C durante 2-3 horas. Interrumpir la reacción con 2000 ml de HCl 1 N (2 x). Lavar dos veces con 500 ml de H<sub>2</sub>O. Añadir 100,0 g de gel de sílice y agitar a 10~20 °C durante 1-2 horas. Filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado y añadir gota a gota n-heptano 1000 ml (5,0 V) con agitación a 10~20 °C. Agitar la mezcla a 10~20 °C durante 3-4 horas. Filtrar y secar la torta a presión reducida a 35~40 °C durante 8-12 h, proporcionando el compuesto del título (307 g de un sólido de color pardo; área de HPLC al 99,1 % (ensayo: 96,8 %); rendimiento del 86 %; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 9,216 (s, 1H), 8,120 (s, 1H), 2,890 (s, 3H), 2,773 (s, 3H).

**Preparación 11****Trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo****Procedimiento A:**

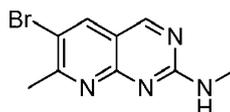
- 5 Calentar una mezcla de trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo (28,6 g, 84 mmol), dimetilformamida (74 ml) y ácido acético glacial (9,61 ml, 169 mmol) a 45 °C y después añadir gota a gota NaOCl acuoso al 6,15 % (lejía, 612 g, 506 mmol) durante 2 h. Calentar a 45-50 °C durante 2 h, enfriar a TA, recoger los sólidos por filtración y lavar con agua (300 ml). Añadir DCM (200 ml) a los sólidos, enfriar la suspensión en un baño de hielo-agua y tratar con una solución de N-metilamina 2,0 M en THF (126 ml, 253 mmol). Permitir que la mezcla
- 10 de caliente lentamente a TA y agitar durante 2 h. Eliminar el disolvente a presión reducida, tratar con metanol (MeOH) (50 ml) y agitar a TA durante 30 min. Recoger el sólido por filtración y lavar con MeOH. Tratar el sólido con EtOAc (30 ml) y agitar a TA durante 30 min. Recoger el sólido por filtración y lavar con EtOAc para obtener el compuesto del título (19,82 g, rendimiento del 73 %). EM (m/z): 323,0 (M+1).

**Procedimiento B:**

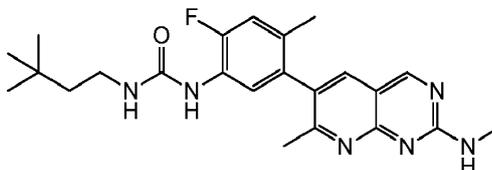
- 15 Cargar el recipiente de reacción con 150 g (0,442 mol, 1,0 equiv. Reactivo limitado) de trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo, añadir 3000 ml de DCM hasta eliminar, enfriar la mezcla a -5~5 °C. Añadir en porciones 105 g (0,442 mol, 1,0 equiv.) de m-CPBA por debajo de 5 °C. Agitar la mezcla a 0~5 °C durante 3~4 horas (E/A = 1 %). Añadir gota a gota 660 ml (1,326 mol, 3,0 equiv.) de Metilamina en THF 2 M por debajo de 10 °C, agitar la mezcla a 0~10 °C durante 3~4 horas. Añadir 1500 ml de DCM y 1000 ml de H<sub>2</sub>O con agitación y separar la fase acuosa. Lavar la capa orgánica con 500 ml H<sub>2</sub>O cuatro veces y concentrar a 600 g por debajo de 40 °C. Intercambiar el disolvente con n-heptano dos veces y agitar la mezcla a 10~20 °C durante 3~4 horas. Filtrar la suspensión. Aclarar con 150 g de n-heptano y secar la torta de filtro a presión reducida a 65~75 °C durante 10-16 h, obteniendo el compuesto del título (129,6 g, 96,5 % de pureza con un rendimiento del 82 %; LC-EM (EM+ = 371,8); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 8,932 (s, 1H), 7,86 (m, 1H), 5,707 (s, 1H), 3,192-3,180 (d, 3H), 2,754 (s, 3H).

**Preparación 12****N,7-Dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2-amina**

- Tratar una solución de 4-amino-2-(metilamino)pirimidin-5-carbaldehído (10 g, 59,1 mmol) en acetona (100 ml) con KOH (3,32 g, 59,1 mmol), agitar a TA durante 10 min, después concentrar a sequedad. Tratar el residuo con EtOAc, lavar con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, después salmuera, secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrar, obteniendo 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidina. EM (m/z): 192,1 (M+1). Añadir una solución de metilamina en etanol (33 %, 80 ml) y calentar a 110 °C durante una noche en un tubo a presión. Eliminar el disolvente a presión reducida y purificar el producto en bruto por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc al 50-100 %/Hexanos), obteniendo el compuesto del título (6,73 g, 65 %, en dos etapas). EM (m/z): 175,1 (M+1).

**Preparación 13****6-Bromo-N,7-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2-amina**

- Enfriar una solución de N,7-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2-amina (6,73 g, 38,6 mmol) en acetonitrilo (160 ml) en un baño de hielo y proteger de la luz con una lámina de aluminio. Añadir N-bromosuccinimida (6,88 g, 38,6 mmol) y agitar a 0 °C durante 2 h. Transferir la reacción a un frigorífico a 5 °C durante 4 días. Recoger el sólido por filtración. Lavar el sólido con DCM y concentrar los lavados, obteniendo el compuesto del título (3,0 g, rendimiento del 31 %). EM (m/z): 253,0/255,0 (M+1).

**Ejemplo 1****1-(3,3-Dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea**

El Ejemplo 1 puede prepararse con el Procedimiento A, el Procedimiento B o el Procedimiento C.

**5 Procedimiento A:**

Combinar 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)urea (25,9 g, 68,5 mmol), trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo (22,09 g, 68,5 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (17,28 g, 206 mmol) en 1,4-dioxano (500 ml) y agua (125 ml) y rociar con argón durante 20 minutos. Añadir *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (3,96 g, 3,43 mmol) y después calentar en una atmósfera de argón a 50 °C. Añadir una porción más de trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo (300 mg, 0,55 mmol) y continuar el calentamiento a 50 °C durante una noche. Enfriar la mezcla a TA, recoger el sólido por filtración y lavar con agua y después éter dietílico. Tratar el sólido con acetonitrilo (50 ml) y calentar la suspensión a 80 °C durante 30 minutos. Recoger el sólido por filtración, lavar con acetonitrilo y secar al vacío a 80 °C, obteniendo un sólido de color amarillo pálido. Tratar el sólido con MeOH (50 ml) y calentar la mezcla a 80 °C durante 1 hora. Enfriar a TA, recoger el sólido por filtración, lavar con MeOH (20 ml) y secar al vacío para obtener el compuesto del título (22,5 g, rendimiento del 77 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido. EM (m/z): 425,2 (M+1).

**Procedimiento B:**

Rociar una suspensión de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)urea (4,48 g, 11,8 mmol), 6-bromo-N,7-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2-amina (3,0 g, 11,8 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,91 g, 35,6 mmol) en dioxano (80 ml) y agua (20 ml) con argón, tratar con *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio (0,685 g, 0,593 mmol) y calentar a 85 °C durante una noche. Eliminar el dioxano a presión reducida, tratar la mezcla con EtOAc y salmuera, separar las fases, secar los productos orgánicos sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrar y purificar por cromatografía sobre gel de sílice (EtOAc del 40 % al 100 %/hexano, EtOAc al 100 %, MeOH al 5 %/EtOAc). Tratar el material con CH<sub>3</sub>CN, calentar a 80 °C durante 1 hora, enfriar a TA y recoger el sólido por filtración, proporcionando el compuesto del título (3,52 g, rendimiento del 70 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido. EM (m/z): 425,2 (M+1).

**Procedimiento C:**

Burbujear con N<sub>2</sub> los disolventes de mezcla 1, 4-dioxano (1250 g) y agua (200 g) en un recipiente de reacción. Calentar la mezcla a 80~85 °C. Cargar 100 g (0,31 mol, 1,0 equiv. reactivo limitado) de trifluorometanosulfonato de 7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-ilo, 117,4 g (0,31 mol, 1,0 equiv.) de 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)urea, 128,7 g (0,93 mol, 3,0 equiv.) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 6,81 g (0,0093 mol, 0,03 equiv.) de Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> en una atmósfera de nitrógeno. Agitar la mezcla a 80~90 °C durante 4~6 horas. Enfriar la mezcla a 40~50 °C. Concentrar y añadir gota a gota 2000 g de agua por debajo de 30 °C. Después de la adición, agitar la mezcla a 10~30 °C durante 6~8 horas. Filtrar y aclarar con 200 g de agua, después lavar la torta. Secar la torta de filtro a presión reducida a 60~70 °C durante 14-16 h, obteniendo API de calidad Tech del compuesto del título (158 g, puro al 90,4 %, ensayo: 63,4 %, KF: 5 %-6 %). Disolver el API de calidad Tech del compuesto del título en 1000 ml de DCM y 1000 ml de EtOH a 10~30 °C. Añadir 50 g de Gel de Sílice, 80 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O y 10 g de carbón activo. Calentar la mezcla a 40~50 °C y agitar durante 3~5 horas y enfriar a 10~30 °C. Filtrar y lavar la torta con 200 g de DCM/EtOH (1:1). Agitar con 5 g de sílice tiol a 40~50 °C y filtrar. Intercambiar dos veces el disolvente con 390,0 g de EtOH. Concentrar y filtrar la suspensión, después lavar la torta con 39,0 g de EtOH. Secar la torta de filtro a presión reducida a 65~75 °C durante 14-16 h, obteniendo API del compuesto del título (61 g, puro al 98,5 %, ensayo: 97,5 %, rendimiento del 65 %; RMN <sup>1</sup>H (d6-DMSO, 400 MHz): δ = 9,077 (s, 1H), 8,278 (s, 1H), 7,968-7,947 (d, 1H), 7,893 (s, 1H), 7,680 (s, 1H), δ 7,193-7,162 (d, 1H), 6,512-6,485 (m, 1H), 3,088-3,035 (m, 2H), 2,924-2,914 (d, 3H), 2,296 (s, 3H), 1,955(s, 3H), 1,344-1,304 (m, 2H), 0,875 (s, 9 H).

**45 Difracción de polvo de rayos X**

Los patrones XRD de los sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuKα λ = 1,54060 Å) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se barre entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,009° en 2θ y una velocidad de barrido de 0,5 segundos/etapa, y con una divergencia de 0,6 mm, 5,28 anti-dispersión fijado y 9,5 mm de abertura del detector. El polvo seco se envasa en un portamuestras de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. Los patrones de difracción de forma cristalina se recogen a temperatura ambiente y humedad relativa. Se conoce bien en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma cristalina proporcionada, las intensidades

relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de factores tales como la morfología y el hábito del cristal. Cuando los efectos de una orientación preferida están presentes, las intensidades de picos se alteran, pero las posiciones del pico característico del polimorfo están inalteradas. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia n.º 23, National Formulary n.º 18, páginas 1843-1844, 1995. Además, también se conoce bien en la técnica de la cristalografía que para cualquier forma cristalina proporcionada, las posiciones de pico angular pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones del pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o la humedad a la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad en la posición del pico de  $\pm 0,2$  en  $2\theta$  tendrá en cuenta estas potenciales variaciones sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede hacer en base a cualquier combinación única de picos distinguibles (en unidades de  $^\circ 2\theta$ ), típicamente los picos más prominentes. El patrón de difracción de forma cristalina, recogido a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajusta basándose en los picos estándar de NIST 675 a 8.853 y 26.774 grados 2-theta.

### **Sólido cristalino de base libre**

Por lo tanto, una muestra preparada del sólido cristalino de base libre del Ejemplo 1 está caracterizada por un patrón XRD usando radiación CuK $\alpha$  por tener picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 a continuación, y en particular por tener picos en 16,0 junto con uno o más de los picos seleccionados entre el grupo que consiste en 6,9, 7,0, 18,2 y 23,2; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

**Tabla 1:** Picos de difracción de polvo de rayos X del sólido cristalino de base libre del Ejemplo 1:

Pico	Ángulo (2-Theta $^\circ$ )	% de Intensidad
1	6,9	80,4
2	7,0	71,3
3	12,1	13,2
4	13,9	11
5	14,1	10,2
6	14,9	36,1
7	16,0	100
8	17,0	16,2
9	18,2	67,5
10	18,4	57,9
11	18,6	57,8
12	20,0	31,1
13	20,5	55,3
14	21,9	36,3
15	22,1	38,3
16	23,2	59,6
17	23,7	46,8
18	26,0	20,7
19	28,0	20,2
20	29,1	32,2
21	29,6	16,5

Se sabe, en líneas generales, que la biodisponibilidad de un compuesto poco soluble puede potenciarse formulándolo como una dispersión sólida en una matriz polimérica. Dichas dispersiones sólidas son dispersiones de fármaco en una matriz de vehículo inerte preparada por fundido (fusión) de mezclas de fármaco-polímero seguido por solidificación de la mezcla fundida homogénea por enfriamiento rápido (por ejemplo, usando procedimientos tales como extrusión, de fusión en caliente), o disolviendo el fármaco y el polímero en disolvente orgánico apropiado seguido por retirada del disolvente por evaporación (por ejemplo, secado por pulverización) o por precipitación usando antidisolvente. Las dispersiones sólidas típicamente convierten el fármaco en una forma amorfa que provoca una tasa más rápida de disolución y/o un mayor grado (proporción) y duración de supersaturación que conduce a biodisponibilidad oral potenciada de compuestos poco solubles respecto al fármaco cristalino no dispersado. Los polímeros que se han usado satisfactoriamente para dispersiones sólidas incluyen (aunque sin limitación)

polivinilpirrolidona (PVP), polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (PVP-VA), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP-55) acetato ftalato de celulosa (CAP), y Eudragit® EPO.

5 La estabilidad física y química de una dispersión sólida son factores en la idoneidad de dichas formulaciones. La carga del fármaco es otra variable que puede afectar a la estabilidad física de la forma amorfa metaestable del fármaco así como su rendimiento *in vivo*. Un modo preferido para administrar una dispersión sólida en seres humanos es formulándola adicionalmente como una cápsula, un comprimido, u otra forma sólida de dosificación oral añadiendo un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros excipientes, adecuados para dicha fabricación y rendimiento de la forma de dosificación. Las dispersiones sólidas pueden dosificarse llenando el polvo o mezcla granulada en cápsulas, como una suspensión en vehículo adecuado o cualquier otra forma oral de dosificación farmacéutica adecuada tal como (aunque sin limitación) comprimidos, sobres, gránulos, rociadores, etc.

Debido a la baja biodisponibilidad del Ejemplo 1, resultante de su mala solubilidad, se desea posibilitar una formulación para conseguir a exposiciones diana en estudios en animales pequeños, perros y ratas, y para ensayo clínico. Un polímero neutro PVP-VA (Kollidon® VA 64) produjo dispersiones sólidas que eran tanto química como físicamente estables en ensayo de estabilidad acelerada (40 °C; humedad relativa del 75 % sobre un período de un mes, así como tras almacenamiento a largo plazo (11 meses para carga de fármaco del 20% y 10 meses para carga de fármaco del 40 %) en condiciones ambientales.

#### **Ejemplo de Composición 1: Ejemplo 1 que contiene una dispersión sólida al 20 %:PVP-VA (20:80)**

Se usa el Ejemplo Cristalino 1 para la preparación de una dispersión sólida. Está disponible en el mercado polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (PVP-VA) con el nombre comercial Kollidon® VA 64 de BASF Corporation. El disolvente es 1:1 de diclorometano y Metanol, preparado mezclando volúmenes iguales de diclorometano (Fisher Scientific) y metanol (OmniSolv). Está disponible en el mercado el lauril sulfato sódico (Fisher Scientific).

**Procedimiento:** Se prepara una dispersión sólida y se seca por pulverización en dos sub-lotes. Para el primer sub-lote, se añade el Ejemplo 1 (22,22 g) en una botella de 2000 ml. Se añaden 1180 ml de disolvente (diclorometano:metanol, 1:1) y el baño de muestra se sonica durante aproximadamente 20 minutos hasta que todo el compuesto se disuelve dando como resultado una concentración teórica de 19 mg/ml. A esta solución se le añaden 88,86 g de PVP-VA y se disuelven por mezcla hasta que se obtiene una solución homogénea. La solución del Ejemplo 1 y PVP-VA (20:80) en diclorometano:metanol (1:1) se seca por pulverización usando un mini secador por pulverización (Buchi Mini Spray Dryer 290). El caudal de la solución es de 9-12 ml/min, con una temperatura de entrada ajustada a 100 °C-110 °C dando como resultado una temperatura de salida de 37-55 °C. Para el segundo sub-lote, se añade el Ejemplo 1 (34,62 g) a una botella de 2000 ml. Se añaden 1820 ml de disolvente (Diclorometano:Metanol, 1:1) y el baño de muestra se sonicó durante aproximadamente 20 minutos hasta que todo el compuesto se disuelve dando como resultado una concentración teórica de 19 mg/ml. A esta solución se le añaden 138,48 g de PVP-VA y se disuelve por mezcla hasta que se obtiene una solución homogénea. La solución del Ejemplo 1 y PVP-VA (20:80) en diclorometano:metanol (1:1) se seca por pulverización usando un mini secador por pulverización (Buchi Mini Spray Dryer 290). El caudal de la solución es de 14-15 ml/min, con una temperatura de entrada ajustada a 100 °C-110 °C dando como resultado una temperatura de salida de 62-70 °C. El material secado por pulverización recogido de ambos sub-lotes se mezcla y se seca adicionalmente en una estufa de vacío durante una noche entre 40-60 °C, y después se almacena al vacío durante un día más a temperatura ambiente.

40 A 236,28 g del Ejemplo 1 que contiene una dispersión sólida:PVP-VA (20:80), se le añaden 4,278 g de lauril sulfato sódico y se mezclan minuciosamente en una placa de cristalización grande usando una espátula para dar una composición final que contiene una dispersión sólida al 98 % más lauril sulfato sódico al 2 %.

Esta formulación puede dosificarse rellenando el polvo mezclado en cápsulas, o en forma de una suspensión por suspensión en un vehículo de, por ejemplo, Hidroxietilcelulosa al 1 %/polisorbato 80 al 0,25 %/antiespumante Dow Corning al 0,05 % 1510-US.

#### **Ejemplo de Composición 2: Ejemplo 1 que contiene una dispersión sólida al 40 %:PVP-VA (40:60)**

El Ejemplo Cristalino 1, polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (PVP-VA), el disolvente y lauril sulfato sódico son como se ha descrito para el Ejemplo de Composición 1.

**Procedimiento:** Se prepara una dispersión sólida mediante un proceso de secado por pulverización sustancialmente como se ha descrito para el Ejemplo de Composición 1 usando 3,79 g del Ejemplo 1, un volumen apropiado de disolvente (diclorometano:metanol, 1:1) para obtener una solución concentrada de 20 mg/ml. A esta solución se le añaden 5,68 g de PVP-VA y se disuelven por mezcla hasta que se obtiene una solución homogénea. La solución se seca por pulverización sustancialmente como se ha descrito para el Ejemplo de Composición 1. El caudal de la solución se ajusta al 40 % usando un tubo de silicona de 2 mm, con una temperatura de entrada ajustada a 80 °C dando como resultado una temperatura de salida de 34 °C. El material secado por pulverización se recoge y se seca adicionalmente en una estufa de vacío durante 14 horas a temperatura ambiente, con una alimentación lenta de nitrógeno y en presencia de un desecante.

A 6,64 g del Ejemplo 1 que contiene una dispersión sólida:PVP-VA (40:60), se le añaden 0,0665 g de lauril sulfato sódico y se mezclan minuciosamente en ajar usando una espátula, dando como resultado una composición final que contiene una dispersión sólida y lauril sulfato sódico en una relación de 99:1.

5 Esta formulación puede dosificarse rellenando el polvo mezclado en cápsulas, o en forma de una suspensión por suspensión en un vehículo de, por ejemplo, Hidroxietilcelulosa al 1 %/polisorbato 80 al 0,25 %/antiespumante Dow Corning al 0,05 % 1510-US.

10 El cáncer está cada vez más reconocido como un conjunto heterogéneo de enfermedades cuyo inicio y progresión se inducen por la función aberrante de uno o más genes que regulan la reparación del ADN, la estabilidad del genoma, la proliferación celular, la muerte celular, la adhesión, la angiogénesis, la invasión, y la metástasis en microentornos celulares y tisulares. Una función variante o aberrante de los genes "cancerosos" puede resultar de polimorfismo de ADN de origen natural, cambios en la cantidad de copias del genoma (a través de amplificación, deleción, pérdida de cromosomas, o duplicación), cambios en la estructura génica y del cromosoma (a través de translocación cromosómica, inversión, u otro reordenamiento que conduzca a expresión génica desregulada), y mutaciones puntuales. Las neoplasias cancerosas pueden inducirse por una función génica aberrante, y mantenerse por la misma función génica aberrante, o el mantenimiento y la progresión pueden exacerbarse por funciones génicas aberrantes adicionales.

15 Más allá de las aberraciones cromosómicas genéticas mencionadas anteriormente, cada uno de los cánceres también puede incluir modificaciones epigenéticas del genoma incluyendo metilación del ADN, impronta genómica, y modificación de histonas por acetilación, metilación, o fosforilación. Una modificación epigenética puede desempeñar un papel de la inducción y/o mantenimiento de la neoplasia.

20 Se han compilado catálogos extensivos de las aberraciones citogenéticas en cáncer humano y se mantienen y actualizan regularmente en línea (véase, The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer at the US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) sitio Web: <http://cgap.nci.nih.gov>). La base de datos incluye aberraciones cromosómicas para al menos algunas de las neoplasias de la presente invención. El Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project mantiene un detallado "Cancer Gene Census" en línea de todos los genes humanos que han estado vinculados de forma causal a tumorigénesis (véase <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>) así como la base de datos COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) de mutaciones somáticas en cáncer humano (véase, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Una fuente adicional que contiene información abundante sobre cambios citogenéticos vinculados de forma causal a diversos cánceres es el Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/Anomliste.html#MDS>). Estas bases de datos también incluyen aberraciones cromosómicas para al menos algunas de las neoplasias de la presente invención.

25 El diagnóstico de neoplasias cancerosas por biopsia, inmunofenotipado y otros ensayos es conocido y usado de forma rutinaria. Además del bandedo cromosómico de alta resolución y las tecnologías avanzadas de imágenes cromosómica, pueden determinarse aberraciones cromosómicas en casos sospechosos de cáncer a través de análisis citogenético tal como hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), cariotipado, cariotipado espectral (SKY), FISH combinado (M-FISH), hibridación genómica comparativa (CGH), series de polimorfismos de un único nucleótido (Chips en SNP) y otros ensayos de diagnóstico y análisis conocidos y usados por los expertos en la materia.

30 La ruta de señalización Ras/Raf/MEK/MAPK transmite estímulos extracelulares al núcleo, regulando de ese modo diversas respuestas celulares incluyendo la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. La perturbación de estos procesos por señalización aberrante de MAPK tal como alteraciones genéticas, a menudo conduce a transformación maligna. La importancia de esta ruta de señalización en neoplasias es evidente a través del descubrimiento de muchos alelos mutantes que activan esta ruta en una diversidad de neoplasias humanas. Mutaciones oncogénicas en receptores tirosina quinasa (RTK), tales como EGFR y cMet, o sobreexpresión de RTK y sus ligandos activan de forma anormal Ras y sus componentes corriente abajo. Se han detectado mutaciones de Ras activadoras en aproximadamente el 30 % de los cánceres humanos. Estas mutaciones disminuyen de forma marcada la actividad GTPasa, llevando de ese modo a Ras al estado unido a GTP y activo. En mamíferos, la familia Ras consiste en tres genes: K-Ras, N-Ras y H-Ras. K-Ras está a menudo mutado en cánceres epiteliales, tales como cáncer pancreático, pulmonar y colorrectal, mientras que a menudo suceden mutaciones en N-Ras en melanoma, neoplasias de hígado y mieloides (AML, CML). Se han descubierto mutaciones activadoras de B-Raf, un miembro de la familia Raf, con alta frecuencia en melanoma y carcinoma de tiroides y, a un menor grado en cáncer colorrectal, de ovario y pulmonar. Se han identificado mutaciones somáticas de MEK1 y MEK2 en pacientes con melanoma. Finalmente, la pérdida de reguladores negativos, tales como miembros de la familia Sprouty y GAP (proteínas activadoras de GTPasa) tales como NF1, pueden activar indirectamente esta ruta. Se cree que muchos tumores muestran desregulación de la ruta Ras/Raf/MEK/MAPK, haciendo que sea una diana atractiva para intervención terapéutica.

35 Las proteínas Raf están compuestas de tres miembros, A-Raf, B-Raf y C-Raf (también llamada Raf1), que desempeñan un papel central en la transducción de señales desde Ras hasta componentes corriente abajo MEK1/2

y ERK1/ERK2. Las proteína quinasas Raf han demostrado desempeñar un papel en el tumorigénesis incluyendo proliferación, supervivencia, invasión y angiogénesis de células tumorales, Sebolt-Leopold y col., *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 937-947; Wellbrock y col., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 875-885. La activación de la ruta de MAPK en células tumorales por múltiples mecanismos tales como mutaciones o sobreexpresión de RTK y mutaciones de Ras, todas pasa todo por las proteínas Raf. De forma más importante, a menudo se observan mutaciones activadoras de B-Raf, Davies y col, *Nature*, 2002, 417: 949-954, en varias neoplasias incluyendo melanoma, carcinoma colorrectal, pulmonar, de ovario y de tiroides. Casi el 90 % de las mutaciones de B-Raf son un cambio T1799A en el exón 15 que provoca una sustitución de aminoácido de Val a Glu (B-Raf V600E). Esta mutación en B-Raf conduce a actividad quinasa constitutiva aproximadamente 500 veces mayor que la de la proteína de tipo silvestre, y transformación maligna. Mutaciones adicionales, tales como T529I, una mutación de tipo guardián de B-Raf de treonina a isoleucina y G468A, una mutación secundaria de B-Raf en G1403C en el exón 11 también son conocidas y se cree que desempeñan un papel en la causa, mantenimiento, o exacerbación de transformación maligna, Whittaker y col., *Sci. Transl. Med.*, 2010, 2(35) ra41; Wan y col., *Cell*, 2004, 116: 855-867.

Recientemente, se aprobó un inhibidor de quinasa específico de B-Raf vemurafenib (también llamado PLX-4032) por la United States Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de pacientes con melanoma con la mutación V600E de B-Raf. Vemurafenib es eficaz y proporciona beneficios de supervivencia en esto pacientes. Sin embargo, los pacientes sensibles a este fármaco generalmente desarrollan resistencia al fármaco que conduce a recidiva de la enfermedad en un promedio de 7 meses. Similar a muchas otras terapias dirigidas, la resistencia adquirida a inhibición de B-Raf presenta un reto terapéutico para el beneficio de supervivencia a largo plazo en esta población de pacientes.

Para mejorar el beneficio de los inhibidores de B-Raf, se sigue investigando para identificar los mecanismos que vuelven a las células de melanoma que expresan B-Raf mutante resistentes a vemurafenib. Estudios recientes han indicado que la reactivación de la ruta de MAPK es un mecanismo de resistencia a la inhibición de B-Raf. Los mecanismos de resistencia implican principalmente la reactivación de la señalización de ERK a través de mecanismos de derivación que son dependientes de Ras/Raf, tal como la activación de N-Ras, Nazarian y col., *Nature*. 2010, 468: 973-7, activación de H-Ras (Su y col., *New England Journal of Medicine*. 2012, 366: 207-215) o regulación positiva de C-RAF, (Johannessen y col., *Nature*. 2010, 468: 968-72; Montagut y col, *Cancer Res*. 2008, 68: 4853-61), variantes con corte y empalme aberrante de B-RAF V600E (Poulikakos y col, *Nature*. 2011, 480: 387-390), o independientes de Ras/RAF (sobreexpresión de Tp12/COT) Johannessen y col., *Nature*. 2010, 468: 968-72. Por consiguiente, múltiples mecanismos podrían atenuar el efecto de la inhibición de B-RAF en la señalización de MAPK en cánceres con B-RAF mutante. Aunque aún no se ha identificado clínicamente una mutación de tipo guardián de B-RAF (T529I) que podría causar resistencia a la inhibición de B-RAF, se ha demostrado experimentalmente que dicha mutación causa resistencia, Whittaker y col., *Sci Transl Med*. 2010, 2(35): ra41. Estudios recientes también han sugerido que la activación de las rutas de señalización redundantes de MAPK por RTK tales como IGF-1R o PDGFR $\beta$  podría desempeñar un papel en resistencia adquirida a la inhibición de B-RAF; Nazarian y col., *Nature*. 2010, 468: 973-7; Villanueva y col., *Cancer Cell*. 2010, 18: 683-95; Shi y col., *Cancer Res*. 2011, 71: 5067-74. Está claro que la reactivación de MAPK está implicada en muchos de estos mecanismos de resistencia. Se espera que un inhibidor de pan-Raf bloquee la reactivación de MAPK.

Adicionalmente, inhibidores específicos de B-Raf incluyendo vemurafenib y su análogo cercano N-[3-(5-cloro-1H-pirrol[2,3-b]piridina-3-carbonil)-2,4-difluorofenil]propano-1-sulfonamida (PLX4720; un inhibidor de R-Raf selectivo disponible en el mercado) demostraron inducir activación paradójica de la ruta a través de dimerización con otras isoformas de Raf en un fondo de tipo silvestre de B-Raf, Hatzivassiliou G, y col., *Nature*, 2010, 464: 431-435; Poulikakos y col., *Nature*, 2010, 464: 427-430; Heidorn, y col., *Cell*, 2010, 140: 209-221. Se cree que vemurafenib activa la ruta Raf/MEK/ERK a través de la unión de B-Raf de tipo silvestre y estimulando la dimerización B-Raf-C-Raf. Esta activación paradójica de la ruta por inhibición específica de B-Raf se cree que es una razón principal de efectos secundarios cutáneos (tales como carcinoma de células escamosas) en algunos pacientes con melanoma tratados con vemurafenib. El vemurafenib no está aprobado para tratamiento de pacientes con cáncer con un fondo genético de tipo silvestre de B-Raf debido a su actividad de activación paradójica de la ruta en este fondo genético.

El compuesto ejemplificado ensayado es un inhibidor de Raf quinasa que inhibe toda las isoformas de proteínas Raf incluyendo A-Raf, B-Raf, C-Raf, y la mutación V600E de B-Raf. Debido a sus actividades pan-Raf, el compuesto ejemplificado ensayado es activo contra células tumorales con activación de la ruta MAPK por señalización corriente arriba tal como mutación de N-Ras y mutación de K-Ras, ambas con fondo genético de tipo silvestre de B-Raf. Por lo tanto, el compuesto ejemplificado ensayado tiene el potencial de tratar pacientes con cáncer con mutación B-Raf (tal como melanoma, carcinoma colorrectal, pulmonar, de ovario y de tiroides), mutación de N-Ras, B-Raf de tipo silvestre (tal como melanoma, AML, CML, ALL, CLL, cáncer hepático), (Schubbert y col., *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7: 295; Pylayeva-Gupta y col., *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11: 761); o mutación de K-Ras, B-Raf de tipo silvestre (tal como tracto biliar, cervical, colorrectal, de endometrio, pulmonar, de ovario, pancreático, y hepático; Schubbert y col., *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7: 295; Pylayeva-Gupta y col., *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11: 761) u otros mecanismos de activación de Raf incluyendo mutación/sobreexpresión de RTK de activación corriente arriba. El compuesto ejemplificado ensayado también es activo contra células tumorales de melanoma que desarrollaron resistencia a vemurafenib. Por lo tanto, se cree que el compuesto ejemplificado ensayado será eficaz para pacientes con melanoma que han fracasado con vemurafenib u otros inhibidores de B-Raf.

El compuesto ejemplificado ensayado también es un inhibidor de c-Kit. c-Kit es un receptor tirosina quinasa que controla normalmente la función de células hematopoyéticas primitivas, melanocitos y células germinales. Después de la unión con su ligando el factor de células madre (SCF), c-Kit experimenta dimerización/oligomerización y autofosforilación. Mutaciones genéticas (tales como L576P, K642E, T670I, y V654A) de c-Kit que activan de forma constitutiva c-Kit pueden conducir a melanoma, leucemia mielógena aguda, y tumores del estroma gastrointestinal (GIST), por lo tanto, el compuesto ejemplificado ensayado tiene el potencial de tratar a pacientes con melanoma, leucemia mielógena aguda y GIST, Lennartsson y col., *Current Cancer Drug Targets*, 2006, 6: 65.

El compuesto ejemplificado puede usarse como agente único o en combinación con uno o más fármacos aprobados diferentes para el tratamiento de pacientes con cáncer. Estos pacientes con cáncer incluyen: pacientes con melanoma con la mutación V600E de B-Raf, pacientes con melanoma que han fracasado con vemurafenib u otros inhibidores de B-Raf, pacientes de melanoma con mutación de N-Ras B-Raf de tipo silvestre, pacientes con melanoma con sobreexpresión de c-Kit o mutación de c-Kit; pacientes con cáncer colorrectal con mutación V600E de B-Raf o mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre; pacientes con cáncer de ovario con la mutación V600E de B-Raf o mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre; paciente con cáncer pulmonar con la mutación V600E de B-Raf o mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre; pacientes con leucemia mieloide con mutación de N-Ras B-Ras de tipo silvestre, o sobreexpresión de c-Kit o mutación de c-Kit; pacientes con cáncer hepático con mutación de N-Ras o K-Ras B-Raf de tipo silvestre; pacientes con cáncer pancreático con mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre; pacientes con carcinoma de tiroides con B-Raf V600E o mutación de N-Ras B-Raf de tipo silvestre; pacientes con cáncer del tracto biliar con mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre; pacientes con GIST con mutación o sobreexpresión de c-Kit.

Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran la actividad inhibidora de la señalización de la ruta Ras/Raf/MEK/ERK del compuesto ejemplificado. Estos ensayos están reconocidos, en líneas generales, por los expertos en la materia como indicativos de actividad quimioterapéutica clínica humana. Como se pone de manifiesto, la inhibición de Raf y la actividad inhibidora de la señalización de la ruta, pueden realizarse sustancialmente del siguiente modo, o por ensayos similares que producen datos similares. Salvo que se indique de otro modo, los valores presentados de  $CI_{50}$  son absolutos.

#### Ensayos enzimáticos de actividades quinasa de B-Raf, C-Raf y mutaciones de B-Raf

El compuesto de ensayo se evalúa para sus actividades inhibidoras contra B-Raf de tipo silvestre humano, C-Raf de tipo silvestre humano, B-Raf V600E humano, B-Raf V600E+T529I humano o B-Raf V600E+G468A humano. T529I es una mutación de tipo guardián de B-Raf de treonina a isoleucina y G468A es una mutación secundaria de B-Raf en G1403C en el exón 11. Los ensayos enzimáticos de B-Raf, C-Raf y mutaciones de B-Raf evalúan una propiedad de Raf y el complejo MEK1, que en presencia de ATP, cataliza una hidrólisis potenciada de ATP (Rominger, y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 464: 130-137; publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0211073). El ADP formado se controla por el sistema PK/LDH acoplado bien conocido (piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa) en forma de oxidación de NADH, que puede controlarse y detectarse de forma espectrofotométrica por absorbancia a 340 nm (A340; para los principios del procedimiento véase Schindler y col., *Science*, 2000, 289: 1938-1942). La actividad ATPasa de MEK1 activada por Raf es una propiedad compartida por todas las isoformas de proteínas Raf.

#### Expresión y purificación de proteínas Raf

En líneas generales, se generan líneas celulares usando materiales disponibles en el mercado por procedimientos conocidos y usados de forma rutinaria por los expertos en la materia. Las secuencias de nucleótidos que codifican el ADN de tipo silvestre de B-Raf de longitud completa (National Center for Biotechnology Information (NCBI), secuencia de referencia NC\_000007.13), C-Raf (National Center for Biotechnology Information (NCBI), secuencia de referencia NC\_000003.11) y A-Raf (National Center for Biotechnology Information (NCBI), secuencia de referencia NC\_000023.10) son conocidas. Véase también, por ejemplo, para B-Raf: S. Ikawa, y col., "B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement," *Mol Cell Biol*, 8(6):2651-4 (1988); para C-Raf: M. Fukui, y col., "Molecular cloning and characterization of an activated human c-raf-1 gene," *Mol Cell Biol*, 7(5):1776-81 (1987); Bonner, y col., "The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene," *Nucleic Acids Res.*, 14 (2), 1009-1015 (1986); para MEK1: C.F. Zheng, y col., "Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2," *J. Biol. Chem.*, 268 (15), 11435-11439 (1993); para información de marcas: J. Tsai, y col., "Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(8), 3041-3046 (2008); G. Hatzivassiliou, y col., "RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth," *Nature*, 464 (7287), 431-435 (2010).

B-RafV600E (restos 433-726 que contienen la mutación V600E) que contiene una marca de purificación N-terminal se expresa y purifica esencialmente como se ha descrito previamente (Wan y col., *Cell*, 2004, 116, 855-867).

Construcciones de B-Raf V600E que contienen una mutación secundaria T529I o mutación G468A se generan por mutagénesis dirigida al sitio (Quikchange, Strategene) de la construcción básica de bRaf (433-726, V600E).

Secuencias que se usan en el presente documento incluyen: B-RafV600E (restos 433-726 que contienen la mutación V600E) con marca de purificación N-terminal; B-RafV600E (restos 433-726 que contienen las mutaciones V600E y T529I) sin marca de purificación N-terminal; B-RafV600E (restos 433-726 que contienen las mutaciones V600E y G468A) sin marca de purificación N-terminal; BRAF-V600E; BRAF-V600E+T529I; BRAF-V600E+G468A; BRAF-de tipo silvestre, de longitud completa; C-RAF; secuencia proteica de MEK1 usada para exploración.

#### Ensayos enzimáticos que miden la actividad Raf quinasa

El compuesto de ensayos se evalúa para sus actividades inhibitoras contra B-Raf de tipo silvestre, C-Raf de tipo silvestre, B-Raf V600E, B-Raf V600E+T529I y B-Raf V600E+G468A. T529I es una mutación de tipo guardián de B-Raf y G468A es una mutación secundaria de B-Raf. Los ensayos enzimáticos de B-Raf, C-Raf y mutaciones de B-Raf evalúan una propiedad de Raf y el complejo MEK1, que en presencia de ATP, cataliza una hidrólisis potenciada de ATP (Rominger, y col., Arch. Biochem. Biophys. 2007, 464: 130-137). El ADP formado se controla por el sistema PK/LDH acoplado bien conocido (piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa) en forma de oxidación de NADH, que puede controlarse y detectarse por absorbancia a 340 nm (A340; para los principios del procedimiento véase Schindler y col., Science, 2000, 289: 1938-1942). La actividad ATPasa de MEK1 activada por Raf es una propiedad compartida por todas las formas de proteínas Raf. En el ensayo enzimático de B-Raf de tipo silvestre, la mezcla de reacción contiene B-Raf 1,2 mM, MEK1 30 mM, ATP 1000  $\mu$ M, 3,5 unidades (por 100  $\mu$ l) de PK, 5 unidades (por 100  $\mu$ l) de LDH, fosfoenol piruvato (PEP) 1 mM, y 280  $\mu$ M de NADH. En el ensayo de C-Raf, la mezcla de reacción contiene C-Raf 0,6 mM, MEK1 26 mM, ATP 2000  $\mu$ M, y la misma cantidad de PK, LDH, PEP y NADH que anteriormente. En el ensayo de B-Raf V600E, la mezcla de reacción contiene B-Raf V600E 1,6  $\mu$ M, MEK1 26 mM, ATP 200  $\mu$ M y la misma cantidad de PK, LDH, PEP y NADH que anteriormente. En el ensayo de B-RafV600E+T529I, la mezcla de reacción contiene B-Raf V600E+T529I 6,2 mM, MEK1 30 mM, ATP 200  $\mu$ M y la misma cantidad de PK, LDH, PEP y NADH que anteriormente. En el ensayo de B-Raf V600E+G468A, la mezcla de reacción contiene B-Raf 3,5 mM, MEK1 30 mM, ATP 200  $\mu$ M y la misma cantidad de PK, LDH, PEP y NADH que anteriormente. Todos los ensayos se inician mezclando la mezcla anterior con el compuesto de ensayo y controlando a A340 de forma continua durante aproximadamente 5 h. Los datos de reacción en la franja de tiempo de 3 a 4 horas se recogen para calcular los valores  $CI_{50}$ .

Para el Ejemplo 1, el resultado de  $CI_{50}$  de la enzima para B-Raf V600E es 6 mM y para C-Raf es 15 mM. Estos datos evidencian que el compuesto ejemplificado inhibe B-Raf V600E y C-Raf en estos ensayos.

El Ejemplo 1 se evalúa en ensayos enzimáticos adicionales realizados por procedimientos sustancialmente similares a los descritos anteriormente. El Ejemplo 1 inhibe B-Raf de tipo silvestre, B-Raf V600E+T529I y B-Raf V600E+G468A con valores de  $IC_{50}$  de 9,8, 15,47 y 16,9 mM, respectivamente. Estos datos evidencian que el Ejemplo 1 es un inhibidor de B-Raf en estos ensayos.

#### Ensayo enzimático de la actividad quinasa de c-Kit

c-Kit es un oncogén importante, y su sobreexpresión y mutaciones genéticas a menudo suceden en pacientes con melanoma y tumor del estroma gastrointestinal (GIST). En el ensayo enzimático de c-Kit, la fosforilación de poli E4Y por ATP catalizada por c-Kit humano se controla de forma espectrofotométrica. El ADP producido de la reacción quinasa se acopla a reacciones de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) donde se forma NAD a partir de piruvato y NADH. Puede detectarse NADH por absorbancia a 340 nm, como se ha descrito anteriormente para ensayos enzimáticos de las actividades quinasa de B-Raf, C-Raf y mutaciones de B-Raf.

#### Expresión y purificación del receptor de tipo silvestre de c-Kit

En líneas generales, se generan líneas celulares usando materiales disponibles en el mercado por procedimientos conocidos y usados de forma rutinaria por los expertos en la materia.

La secuencia de nucleótidos que codifica el ADN del receptor de c-Kit de tipo silvestre humano de longitud completa (National Center for Biotechnology Information (NCBI) secuencia de referencia NC 000004.11), es conocida. Véase también, por ejemplo, para la secuencia proteica de cKit humano: Y. Yarden, Y., y col., "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand," EMBO J. 6 (11), 3341-3351 (1987); para proteínas de fusión de GST: D.B. Smith, y col., "Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase," Gene 67 (1988) 31-40; D.B. Smith, "Purification of glutathione S-transferase fusion proteins," Methods Mol. Cell Biol. 4 (1993) 220-229.

#### Ensayos de c-Kit

La mezcla de reacción del ensayo incluye c-KIT de tipo silvestre humano 6 mM, 1 mg/ml de poli(Glu, Tyr) (Sigma), fosfoenol-piruvato 1 mM, NADH 280  $\mu$ M, 5 U/3,5 U (por 100  $\mu$ l) de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa, Tris 85 mM, pH 7,5,  $MgCl_2$  17 mM, Triton® X-100 al 0,0042 %, BSA al 0,005 %, DMSO al 1 %. El compuesto de ensayo se incubaba con la mezcla de reacción durante 0,5 horas antes de añadir ATP 200  $\mu$ M para iniciar la reacción a 30 °C. Se usan las velocidades de reacción a 0,5 a 1 horas para calcular el % de inhibición y las  $CI_{50}$ .

Una secuencia que se usa en el presente documento incluye c-KIT con la fusión N-terminal de GSM.

Para el Ejemplo 1, el resultado de la  $CI_{50}$  de inhibición de c-Kit humano es 21 mM. Este dato evidencia que el compuesto ejemplificado ensayado es un inhibidor de c-Kit de tipo silvestre humano en este ensayo.

Para evaluar adicionalmente el compuesto de ensayo, se ensaya frente a mutaciones de c-Kit que aparecen habitualmente en melanoma y/o GIST. Se transfecta la línea celular Ba/F3 (de la ATCC) con c-Kit de tipo silvestre (WT), c-Kit L576P (Willmore-Payne y col., Human Pathology, 2005, 36(5), 486; Willmore-Payne y col., Human Pathology, 2006, 37, 520), c-Kit K642E (Willmore y col., Am J Clin Pathol, 2004, 122(2), 206; Monsel y col., Oncogene, 2010, 29, 227), c-Kit T670I (Tamborini y col., Oncogene, 2006, 25, 6140), o c-Kit V654A (Tamborini y col., Oncogene, 2006, 25, 6140), se establecen respectivamente por procedimientos de transfección retroviral bien conocidos y usados por los expertos en la materia. Las mutaciones se generan por mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se confirman por secuenciación automatizada de la construcción de expresión de c-Kit amplificada por PCR. Se generan líneas celulares estables Ba/F3 por transfección con ADN plasmídico. La expresión de los mutantes apropiados de c-Kit se confirma por análisis de transferencia de Western.

Las células Ba/F3 de tipo silvestre generalmente son dependientes de IL-3 para el crecimiento. Después de la transfección con c-Kit, estas células se cultivan en medio de cultivo recomendado por la ATCC para Ba/F3 en presencia de factor de células madre (SCF), el ligando de c-Kit. Las actividades anti-proliferación de los compuestos de ensayo contra estas células se ensayan en presencia de IL-3 o SCF.

Tabla 2: Actividades anti-proliferación del Ejemplo 1 en líneas celulares Ba/F3 de c-Kit

Actividades anti-proliferación ( $CI_{50}$ , $\mu$ M) del Ejemplo 1 en líneas celulares de c-Kit Ba/F3							
Compuesto de ensayo	Tratamiento	Ba/F3	Ba/F3 c-Kit WT	Ba/F3 c-Kit L576P	Ba/F3 c-Kit K642E	Ba/F3 c-Kit T670I	Ba/F3 c-Kit V654A
Ejemplo 1	SCF	ND	0,062	0,179	0,047	0,29	0,086
	IL-3	ND	2,858	2,079	1,200	5,919	2,942

Los datos de la Tabla 2 evidencian que el Ejemplo 1 tiene actividad inhibidora de la proliferación y viabilidad celular contra c-Kit de tipos silvestre y las mutaciones genéticas de c-Kit identificadas en células Ba/F3.

#### Medición de las actividades de Raf Quinasa con enzimas completas nativas usando ensayo KiNativ de ActivX Biosciences Inc.

Para evaluar adicionalmente las actividades enzimáticas de pan-Raf del compuesto de ensayo, se evalúa en un ensayo KiNativ desarrollado y realizado por ActivX Biosciences Inc. usando lisados de células completas de células A375. Las células A375 son células de melanoma humano con una mutación V600E de B-Raf, A-Raf de tipo silvestre y C-Raf de tipo silvestre.

**Preparación de la muestra:** Se lisan células A375 (B-Raf V600E) de la **ATCC** por sonicación en tampón de lisis disponible en el mercado, se retiran los desechos celulares por centrifugación, y se filtra en gel el sobrenadante resultante en un tampón de reacción de quinasa disponible en el mercado que contiene  $MnCl_2$  20 mM. La concentración final de proteínas de los lisados son 10 mg/ml. Se añaden 5  $\mu$ l de cada compuesto de ensayo de soluciones madre 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, o 0,1  $\mu$ M en DMSO a 500  $\mu$ l de lisado por duplicado para concentraciones finales de 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, y 0,001  $\mu$ M. Se añaden 5  $\mu$ l of DMSO a 500  $\mu$ l de lisado por cuadruplicado para los controles. Después de incubación de 15 minutos, se añade sonda de destiobiotina-ATP acilfosfato a cada muestra hasta una concentración final de 5  $\mu$ M y se incuba con las muestras durante 10 minutos. Después de la reacción de la sonda, se preparan muestras para análisis dirigido de espectro de masas usando el protocolo convencional ActivX. En resumen, se preparan muestras para digestión con tripsina (desnaturaliza, reduce alquilato), se digieren con tripsina, y se enriquecen péptidos destio-biotinilados en resina de estreptavidina.

**Recogida de datos:** Se analizan muestras enriquecidas en péptido por CL-EM/EM en un espectrómetro de masas de captura de iones Thermo-LTQ Velos usando la metodología de recogida de datos ActivX para células A375 V600E.

**Análisis de datos:** Todas las cuantificaciones se realizan extrayendo señales de iones de fragmentos característicos de espectros EM/EM dirigidos y comparando las señales en muestras de control y tratadas. Se usa el software ActivX con validación manual/inspección visual realizada según lo necesario en base a las medidas de marcaje/filtrado de datos. Todos los datos puntuales de inhibición se verifican visualmente, así como todos los datos puntuales que muestran variabilidad fuera de los límites normales. La significancia de los datos puntuales que muestran inhibición >35 % se determina de acuerdo con la siguiente fórmula: áreas promedio de pico de control -

áreas promedio de pico tratado/(2\*DesTip(áreas de pico de control) + |área de pico de réplica uno tratada - área de pico de réplica dos tratada|) > 0,8. Los valores de  $CI_{50}$  se determinan usando el software IGOR®.

Tabla 3. Actividades pan-Raf del Ejemplo 1 en ensayo de lisado de células completas A375 ActivX KiNativ

Ejemplo 1 (nM)	% de inhibición				$CI_{50}$ (nM)
	1000	100	10	1	
B-Raf (V600E)	96,5	82,9	19,7	8,1	31
B-Raf (V600E)	>98	82	7,5	-10	47
A-Raf (WT)	72	53,6	13,4	4,3	44
C-Raf (WT)	79,3	50,8	23,9	-11	42

- 5 Como se muestra en la Tabla 3, el Ejemplo 1 inhibía A-Raf, B-Raf V600E y C-Raf con valores de  $CI_{50}$  de 44, 31-47, y 42 mM, respectivamente. Estos datos evidencian la inhibición del Ejemplo 1 de A-Raf, C-Raf y B-Raf V600E en un ensayo de lisado de células completas.

#### **El Ejemplo 1 inhibe la actividad fosfo-ERK celular**

- 10 Para investigar si las actividades bioquímicas *in vitro* del Ejemplo 1 se traducen en actividades celulares, se usa el Ejemplo 1 para tratar células de melanoma, células A375 V600E, y WM-266-4 V600E, células resistentes A375 V600E-PLX4032 (A375-res; generación a continuación) y células HCT-116 (mutante de K-Ras B-Raf de tipo silvestre), una célula de tumor de colon con una mutación en K-Ras. El mutante A375 V600E, WM-266-4 V600E, HCT-116 K-Ras B-Raf de tipo silvestre son de la ATCC. Las actividades celulares se evalúan por un ensayo ELISA disponible en el mercado de TGR Bioscience para medir los niveles de fosfo-ERK de cada tipo celular.

- 15 Se cultivan células resistentes A375 V600E, A375 V600E-PLX4032, células WM-266-4 V600E, o HCT-116 (K-Ras mutante B-Raf de tipo silvestre) en medio de cultivo (descrito a continuación para el ensayo CellTiterGlo) en placas de 96 pocillos de PerkinElmer durante una noche, después se tratan con Ejemplo 1 a 0 y 11 diferentes concentraciones de diluciones en serie que varían de 0,17 a 10000 mM durante 1 hora. Las células en cada pocillo después se lisan con 50  $\mu$ l de tampón de lisis de TGR Bioscience. Las actividades fosfo-ERK se determinan con el  
20 kit de ensayo SureFire fosfo-ERK AlphaScreen de TGR Bioscience según las instrucciones del fabricante.

- El Ejemplo 1 inhibía el nivel de fosfo-ERK de un modo dependiente de la dosis en todas las líneas celulares ensayadas. Los valores de  $CI_{50}$  para células A375 V600E, WM-266-4 V600E, A375 V600E-res y HCT-116 (K-Ras mutante B-Raf de tipo silvestre) son 3, 4,9, 9,7 y 132,8 mM, respectivamente. Estos datos evidencian que el ejemplo 1 inhibe la señalización corriente abajo en células A375 V600E, WM-266-4 V600E, A375 V600E-res y HCT-116 K-Ras mutante B-Raf de tipo silvestre como resultado de la inhibición de Raf en este ensayo.  
25

#### **Ensayo de proliferación y viabilidad de células CellTiter-Blue**

##### **Ensayo de proliferación de células A375**

- Se obtienen células A375 (n.º de catálogo CRL-1619) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). En resumen, se cultivan células en DMEM de alto contenido en glucosa suplementado con suero bovino fetal caracterizado al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) y penicilina al 1%/estreptomycin/L-glutamina a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Se permite que las células se expandan hasta alcanzar confluencia del 70-95 %, punto en el cual se subclonan o recogen para uso en el ensayo. Se distribuye una dilución en serie del compuesto de ensayo en una placa de fondo transparente negro de 384 pocillos por triplicado. Se añaden seiscientos veinticinco células por pocillo en 50  $\mu$ l de medio completo de cultivo en la placa de 384 pocillos. Las placas se incuban durante 67 horas a  
35 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Al final del periodo de incubación, se añaden 10  $\mu$ l de una solución 440  $\mu$ M de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS a cada pocillo de la placa y las placas se incuban durante 5 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Las placas se leen en un lector Synergy2 (Biotek, Winooski, VT) usando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Los datos se analizan usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para calcular los valores de  $CI_{50}$ .

##### **Ensayo de proliferación de células Colo-205**

- Se obtienen Colo-205 (n.º de catálogo HB-8307) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). En resumen, las células se cultivan en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal caracterizado al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA), piruvato sódico 1 mM y penicilina al 1%/estreptomycin/L-glutamina a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Se deja que las células se expandan hasta alcanzar confluencia del 30-60 %, punto en el cual se subclonan o recogen para uso en el ensayo. Se distribuye una dilución en serie del compuesto de ensayo en una placa de fondo transparente negro de 384 pocillos por triplicado. Se añaden mil doscientas cincuenta células por pocillo en 50  $\mu$ l de medio completo de cultivo en la placa de 384 pocillos. Las placas se incuban durante 67 horas a  
45

37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Al final del periodo de incubación, se añaden 10 µl de una solución 440 µM de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS a cada pocillo de la placa y las placas se incuban durante 5 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Las placas se leen en un lector Synergy2 (Biotek, Winooski, VT) usando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Los datos se analizan usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI<sub>50</sub>.

**Ensayo de proliferación de células HT-29**

Se obtienen HT-29 (n.º de catálogo HTB-38) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). En resumen, las células se cultivan en 5A de McCoy suplementado con suero bovino fetal caracterizado al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA), y penicilina al 1%/estreptomicina/L-glutamina a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Se deja que las células se expandan hasta alcanzar confluencia del 75-90 %, punto en el cual se subclonan o recogen para uso en el ensayo. Se distribuye una dilución en serie del compuesto de ensayo en una placa de fondo transparente negro de 384 pocillos por triplicado. Se añaden mil doscientas cincuenta células por pocillo en 50 µl de medio completo de cultivo en la placa de 384 pocillos. Las placas se incuban durante 67 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Al final del periodo de incubación, se añaden 10 µl de una solución 440 µM de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS a cada pocillo de la placa y las placas se incuban durante 5 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Las placas se leen en un lector Synergy2 (Biotek, Winooski, VT) usando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Los datos se analizan usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI<sub>50</sub>.

**Ensayo de proliferación de células HCT-116**

Se obtienen HCT-116 (n.º de catálogo CCL-247) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). En resumen, las células se cultivan en 5A de McCoy suplementado con suero bovino fetal caracterizado al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA), y penicilina al 1%/estreptomicina/L-glutamina a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Se deja que las células se expandan hasta alcanzar confluencia del 75-90 %, punto en el cual se subclonan o recogen para uso en el ensayo. Se distribuye una dilución en serie del compuesto de ensayo en una placa de fondo transparente negro de 384 pocillos por triplicado. Se añaden seiscientos veinticinco células por pocillo en 50 µl de medio completo de cultivo en la placa de 384 pocillos. Las placas se incuban durante 67 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Al final del periodo de incubación, se añaden 10 µl de una solución 440 µM de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS a cada pocillo de la placa y las placas se incuban durante 5 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Las placas se leen en un lector Synergy2 (Biotek, Winooski, VT) usando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Los datos se analizan usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI<sub>50</sub>.

**Ensayo de proliferación de células SK-Mel-2**

Se obtienen Sk-Mel-2 (n.º de catálogo HTB-68) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). En resumen, las células se cultivan en MEM suplementado con suero bovino fetal caracterizado al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA), piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y penicilina al 1%/estreptomicina/L-glutamina a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Se deja que las células se expandan hasta alcanzar confluencia del 75-90 %, punto en el cual se subclonan o recogen para uso en el ensayo. Se distribuye una dilución en serie del compuesto de ensayo en una placa de fondo transparente negro de 384 pocillos por triplicado. Se añaden mil doscientas cincuenta células por pocillo en 50 µl de medio completo de cultivo en la placa de 384 pocillos. Las placas se incuban durante 67 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Al final del periodo de incubación, se añaden 10 µl de una solución 440 µM de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS a cada pocillo de la placa y las placas se incuban durante 5 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, y humedad del 95 %. Las placas se leen en un lector Synergy2 (Biotek, Winooski, VT) usando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Los datos se analizan usando el software Prism (Graphpad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI<sub>50</sub>.

Las células A375, HT-29, y Colo-205 (ATCC) albergan una mutación V600E. Las células HCT-116 (ATCC) albergan una mutación en K-Ras B-Raf de tipo silvestre, y las células SK-Mel-2 (ATCC) albergan una mutación en N-Ras B-Raf de tipo silvestre.

Tabla 4 Inhibición de la proliferación y viabilidad celular

Ejemplo n.º	CI <sub>50</sub> de inhibición de la proliferación celular, nM				
	A375	HT-29	Colo-205	HCT-116	SK-Mel-2
1	9	7	27	224	158

Los datos de la Tabla 4 evidencian que el compuesto ejemplificado inhibe la proliferación y viabilidad de las células especificadas que albergan las mutaciones identificadas en este ensayo.

**Actividad de inhibición de la proliferación y viabilidad**

Se ensaya el Ejemplo 1 para la actividad de inhibición de la proliferación y viabilidad a través de un panel diverso de líneas de células tumorales humanas en ensayos CellTiterGlo.

5 En líneas generales, para el ensayo CellTiterGlo (Promega), las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Thermo Scientific) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Invitrogen). Las células ( $5 \times 10^3$ ) mantenidas en medio de cultivo, se siembran en pocillos recubiertos con poli-D-Lisina en placas de 96 pocillos (BD Biosciences) un día antes del tratamiento. Las células se tratan durante 48-72 horas, y después se analizan para la proliferación y viabilidad usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiterGlo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega) y un lector de placa SpectraMax (Molecular Devices). Se usa  
10 regresión no lineal y curvas sigmoideas de respuesta a dosis para calcular la concentración inhibidora la mitad de la máxima ( $CI_{50}$ ) con el software GraphPad Prism 4.

Se ensayaron líneas celulares de cáncer hemático adicionales de N-RAS mutante B-Raf de tipo silvestre para la sensibilidad al Ejemplo 1. Mutaciones que activan N-Ras son habituales en cánceres hemáticos que suceden a una frecuencia del 10-30 %. Se ensayaron dos líneas celulares de melanoma de B-Raf V600E mutante (A-375 y SK-Mel-28), nueve líneas celulares hemáticas de N-Ras mutante (HL-60, THP-1, TALL-1, C8166, H9, IM-9, GA-10 clon 4, P31-FUJ, MOLT-4) y siete líneas celulares de N-Ras de tipo silvestre (LOUCY, HEL, U266, EB2, P30-OHK, NOMO-1, CCRF-CEM), y se presentaron los datos de  $CI_{50}$ . Aunque hubo un intervalo de sensibilidad entre estas líneas celulares, 7 de las 9 líneas celulares de cáncer hemático con mutaciones de N-Ras B-Raf de tipo silvestre eran sensibles a concentraciones submicromolares de Ejemplo 1 ( $CI_{50} < 1 \mu M$ ).

20 Tabla 5 Actividad de inhibición de la proliferación y viabilidad del Ejemplo 1 en nM

Abs $CI_{50}$	Rel $CI_{50}$	Denominación de LÍNEA_CELULAR	Disponible en el mercado
0,04	0,03	SK-Mel-28	ATCC
0,05	0,04	COLO-829	ATCC
0,06	0,03	HepG2	ATCC
0,08	0,03	THP-1	ATCC
0,11	0,03	A375	ATCC
0,13	0,06	SK-Mel-5	ATCC
0,17	0,09	NCI-H1993	ATCC
0,19	0,12	LOVO	ATCC
0,2	0,25	GA-10-Clone-4	ATCC
0,2	0,14	HL-60	ATCC
0,24	0,22	Calu-6	ATCC
0,33	0,19	H9	ATCC
0,33	0,33	KATOIII	ATCC
0,38		IM-9	ATCC
0,39	0,23	BxPC-3	ATCC
0,44	0,13	HuH-7	JCRB Cellbank
0,44		P31-FUJ	JCRB Cellbank
0,6	0,42	DMS-53	ATCC
0,68	0,21	NUGC-3	Health Science Research Resources B
0,69	0,23	SW900	ATCC
0,72	0,42	HCT-116	ATCC
0,75		TALL-1	JCRB Cellbank
0,8	0,36	Hep3B2.1-7	ATCC
0,81	0,2	A2780	Sigma-Aldrich
0,83	0,41	NCI-H2030	ATCC
0,91	0,14	NCI-H1299	ATCC
0,93	0,69	NCI-H1975	ATCC
0,98	0,76	Hs746T	ATCC
0,98	0,5	HT-1080	ATCC
0,98	1,87	MV-4-11	ATCC
1,09	0,56	C8166	Sigma-Aldrich
1,09	0,31	MIA-PaCa-2	ATCC
1,1		U-266	ATCC
1,14	0,34	AGS	ATCC
1,22	0,38	AsPC-1	ATCC
1,22	1,08	LN 229	ATCC
1,27	0,33	NCI-H2052	ATCC
1,43		P30-OHK	JCRB Cellbank
1,5		CCRF-CEM	ATCC
1,87	2,01	SNU-449	ATCC
1,96	0,19	22RV1	ATCC

(continuación)

Abs CI50	Rel CI50	Denominación de LÍNEA_CELULAR	Disponible en el mercado
1,96	0,31	SK-HEP-1	ATCC
1,99	0,59	huH-1	JCRB Cellbank
2,63		NOMO-1	JCRB Cellbank
2,86	0,46	SW620	ATCC
2,91	2,03	Caki-1	ATCC
4,42	2,07	A549	ATCC
4,5	0,22	NCI-H522	ATCC
4,92	0,26	RKO	ATCC
5,18	0,66	DU-145	ATCC
5,21	0,76	U-118-MG	ATCC
5,72	0,87	MKN45	JCRB Cellbank
6,27	0,69	NCI-H23	ATCC
6,93		LOUCY	ATCC
8,35	12,74	NCI-H1436	ATCC
9,58	5,32	CaOV-3	ATCC
11,63	10,89	BT-474	ATCC
11,92	1,58	NCI-H2009	ATCC
13,37	6,97	NCI-H838	ATCC
15,07	16,27	NCI-H1694	ATCC
15,09	1,01	M059K	ATCC
15,13	19,95	NCI-H2170	ATCC
>20	4,58	786-0	ATCC
>20	0,6	C3A	ATCC
>20	0,5	EB2	ATCC
>20	>20	HCC70	ATCC
>20		HEL	ATCC
>20	0,06	HT-29	ATCC
>20	>20	LN18	ATCC
>20	2,74	LNCaP-Clone-FGC	ATCC
>20	0,26	MDA-MB-436	ATCC
>20	1,21	MOLT-4	ATCC
>20	0,47	NCI-H1155	ATCC
>20	0,99	NCI-H1573	ATCC
>20	0,36	NCI-H1793	ATCC
>20	>20	NCI-H2081	ATCC
>20	>20	NCI-H2126	ATCC
>20	1,18	NCI-H2228	ATCC
>20	12,55	NCI-H661	ATCC
>20	>20	PC-3	ATCC
>20	11,72	PLC-PRF-5	ATCC
>20	>20	SiHa	ATCC
>20	10,8	SK-OV-3	ATCC
>20	4,34	U-87-MG	ATCC

5 Los datos anteriores evidencian que células de melanoma A375 son sensibles al Ejemplo 1. Entre las líneas celulares más sensibles en este tamiz están las células HepG2 y THP-1. HepG2 se obtiene de un carcinoma hepatocelular, THP-1 es una línea celular AML, y ambas portan mutaciones activadoras de N-Ras B-Raf de tipo silvestre. Los datos evidencian la actividad inhibidora de pan-Raf y la intervención de la activación de señalización corriente arriba por el Ejemplo 1 en este ensayo.

#### El Ejemplo 1 inhibe el crecimiento celular de células HCT-116 con mutación de K-Ras:

10 Una mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre es una de las mutaciones más habituales y más importantes en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer pancreático, pulmonar y colorrectal (Bos, Cancer Research, 1989, 49(17): 4682). La mutación de K-Ras conduce a la activación de la cascada Ras/Raf/MEK/MAPK que contribuye a la transformación y malignidad de las células. Para evaluar la actividad antiproliferación del Ejemplo 1 en células K-Ras mutantes B-Raf de tipo silvestre, se usan células HCT-116 de tumor de colon (ATCC) que albergan una mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre en un ensayo de proliferación y viabilidad celular CellTiterGlo. El Ejemplo 1 inhibía la  
15 proliferación y viabilidad de HCT-116 con mutación de K-Ras B-Raf de tipo silvestre de un modo dependiente de la dosis con una  $CI_{50}$  de 178 mM. Estos datos evidencian que la actividad inhibidora de Raf por el Ejemplo 1 interviene en la señalización corriente arriba activada de forma inapropiada en este ensayo.

**El Ejemplo 1 inhibe el crecimiento celular de células tumorales con mutación de N-Ras:**

N-Ras a menudo está mutado en melanoma, leucemia mieloide aguda (AML), y cáncer hepático (Bos, Cancer Research, 1989, 49(17): 4682). Mutaciones de N-Ras B-Raf de tipo silvestre conduce a activación de MAPK a través de proteínas Raf, particularmente C-Raf. Se ensaya la actividad antiproliferación del Ejemplo 1 en células tumorales N-Ras mutantes B-Raf de tipo silvestre, la línea celular de melanoma humano SK-Mel-2 que alberga la mutación de N-Ras Q61R, y B-Raf de tipo silvestre (ATCC), en el ensayo CellTiterGlo para la inhibición de la proliferación y viabilidad celular y se realiza análisis de transferencia de Western.

**Análisis de inmunotransferencia (transferencia de Western)**

Se realiza el ensayo a dosis de 0, y 11 diluciones en serie que varían de 0,17 a 10000 mM. El lisado proteico se genera por tratamiento de las células con tampón de lisis RIPA de Millipore. El análisis de transferencia de Western se realiza sustancialmente como se describe en Yadav y col, Molecular Carcinogenesis, 2011, 50: 346-52. En resumen, se realiza SDS-PAGE sobre lisados celulares que contienen 20 µg de proteína total usando geles con gradiente de tri-glicina Novex® del 4-20% (Invitrogen). La proteína se transfiere a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µM usando tampón de transferencia NuPAGE® (Invitrogen) y metanol al 10 % a 100 V, 4 °C durante 1 hora. En líneas generales, se usa el anticuerpo primario a dilución de 1:1000, y el anticuerpo secundario a dilución de 1:20000. Las proteínas se detectan usando el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (Li-COR Biosciences). Se obtienen anticuerpos contra ERK1/2, fosfo-ERK1/2, fosfo-MEK1/2, y actina de Cell Signaling Technology.

El Ejemplo 1 muestra inhibición de fosfo-MEK y fosfo-ERK dependiente de dosis en células SK-Mel-2 que albergan la mutación de N-Ras Q61R, y B-Raf de tipo silvestre como se determina por análisis de transferencia de Western. La actividad fosfo-ERK se elimina sustancialmente a una dosis de 370 mM.

El Ejemplo 1 inhibe la proliferación y viabilidad de células SK-Mel-2 en el ensayo CellTiter-Glo con una  $CI_{50}$  de 188 mM. Estos datos evidencian que el Ejemplo 1 inhibía la proliferación y viabilidad celular en células SK-MEL-2 que albergaban B-Raf de tipo silvestre y la mutación de N-Ras Q61R en este ensayo.

**Actividad del Ejemplo 1 en la inhibición de células de melanoma resistentes a vemurafenib**

Vemurafenib (PLX4032) y PLX4720 son inhibidores del mutante B-Raf V600E (Johannessen y col, Nature, 2010, 468: 968-72; Montagut y col, Cancer Res. 2008, 68: 4853-61; Wagle y col, Journal of Clinical Oncology, 2011, 29: 3085-96). Algunos de los pacientes que inicialmente responden a terapia con vemurafenib desarrollan resistencia al fármaco y se vuelven refractarios en un promedio de 7 meses, Whittaker y col, Sci Transl Med. 2010, 2: 35-41. Se genera una línea celular resistente a vemurafenib por tratamiento crónico de la línea celular de melanoma humano A375 (ATCC) que alberga la mutación de B-Raf V600E con concentraciones crecientes de PLX4720.

**Generación de líneas celulares de melanoma B-Raf V600E resistentes a inhibición de B-Raf**

Para generar células resistentes, se cultivan células A375 B-Raf V600E (ATCC) en medio de cultivo, como se ha descrito anteriormente para el ensayo CellTiter-Glo, en presencia de concentraciones gradualmente crecientes de N-[3-(5-cloro-1H-pirroló[2,3-b]piridina-3-carbonil)-2,4-difluorofenil]propano-1-sulfonamida (PLX4720; un inhibidor selectivo de B-Raf disponible en el mercado) de 0,02 a 2 µM a través de aproximadamente 4 meses y 30 pases para producir una línea celular resistente denominada A375res. La resistencia de A375res a vemurafenib y PLX4720 se confirma por reactivación de MAPK por análisis de transferencia Western y desplazamiento de los valores de  $CI_{50}$  en el ensayo de proliferación y viabilidad celular CellTiter-Glo.

En estas células A375res, PLX4032 pierde mucha de su actividad desplazándose casi 30 veces desde 252 mM hasta más de 7 µM. La actividad del Ejemplo 1 contra estas células resistentes evidencia un  $CI_{50}$  de 34 mM que se desplaza solamente 3 veces desde 11 mM. Estos datos evidencian que el Ejemplo 1 inhibía la proliferación y viabilidad celular en células A375res en este ensayo.

**El Ejemplo tiene activación paradójica mínima de la ruta**

Recientes estudios publicados (véase anteriormente) sugieren que inhibidores específicos de B-Raf, tales como vemurafenib (PLX-4032) inducen "activación paradójica de la ruta" a través de dimerización de B-Raf con otras isoformas de Raf en fondos de tipo silvestre de B-Raf. Vemurafenib no está aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de tipo melanoma con fondo genético de tipo silvestre de B-Raf. Esta activación paradójica de la ruta también se cree que es una causa de los efectos secundarios cutáneos (tales como carcinoma de células escamosas) en algunos pacientes con melanoma tratados con vemurafenib.

El Ejemplo 1 se ensaya contra células HCT-116 (ATCC) que albergan B-Raf de tipo silvestre y mutación en K-Ras en un ensayo de viabilidad CellTiter-Glo. El ensayo se realiza a dosis de 0, y 11 diluciones en serie que varían de 0,17 a 10000 mM. Se evaluaron las actividades fosfo-MEK y fosfo-ERK por análisis de inmunotransferencia (transferencia de Western).

El Ejemplo 1 evidenció activación paradójica mínima de la ruta, y mantiene las actividades inhibitoras de fosfo-MEK y fosfo-ERK en células HCT-116 que albergan B-Raf de tipo silvestre y fondo genético K-Ras. El Ejemplo 1 elimina sustancialmente la señal fosfo-ERK a dosis por encima de 41 mM en este ensayo. Como el Ejemplo 1 también evidencia inhibición de C-Raf (ensayos previos, anteriormente) se cree que no debe suceder activación paradójica de la ruta.

#### El Ejemplo 1 inhibe el crecimiento celular de células tumorales con la mutación V600E de B-Raf:

Las mutaciones de B-Raf, particularmente B-Raf V600E en cáncer humano, a menudo se observan en neoplasias humanas incluyendo melanoma, cáncer colorrectal, pulmonar y de ovario. Esta mutación en B-Raf puede conducir a actividad quinasa constitutiva y transformación maligna. El Ejemplo 1 se ensaya en el ensayo CellTiter-Glo en tres líneas celulares de melanoma A375 (ATCC), WM-266-4 (ATCC) y SK-Mel-28 (ATCC), y dos líneas celulares de tumor de colon HT-29 (ATCC) y Colo-205 (ATCC); las cinco líneas celulares tienen una mutación V600E de B-Raf.

Tabla 6. Actividad del Ejemplo 1 contra células tumorales que albergan la mutación V600E de B-Raf

Línea celular	Mutación	Tipo de tumor	CI <sub>50</sub> (nM)
A375	B-Raf V600E	melanoma	9,2
WM-266-4	B-Raf V600E	melanoma	52,9
SK-Mel-28	B-Raf V600E	melanoma	29
HT-29	B-Raf V600E	colon	7,3
Colo-205	B-Raf V600E	colon	27

El Ejemplo 1 inhibía la viabilidad celular de tres líneas de melanoma, A375, WM-266-4 y SK-Mel-28 con valores de CI<sub>50</sub> de 9,2, 52,9 y 29 mM, respectivamente. Asimismo, el Ejemplo 1 inhibía la viabilidad celular de dos líneas celulares de colon, HT-29 y Colo-205 con valores de CI<sub>50</sub> de 7,3 y 27 mM. Los datos evidencian que el Ejemplo 1 es activo en la inhibición de la viabilidad y crecimiento celular de células tumorales con la mutación V600E de B-Raf en este ensayo.

El Ejemplo 1 también inhibía las actividades fosfo-MEK y fosfo-ERK en las células A375 ensayadas anteriormente que se evaluaron adicionalmente por análisis de transferencia de Western que evidencia inhibición de la señalización corriente abajo de un modo dependiente de la dosis. La actividad Fosfo-ERK se eliminó sustancialmente a 41 mM.

#### Actividad *in vivo*

Para evaluar la actividad *in vivo* del Ejemplo 1, se usan modelos de tumor por xenoinjerto A375 V600E (ATCC) y HCT-116 K-Ras mutante B-Raf de tipo silvestre (ATCC). En resumen, se implantan 10 x 10<sup>6</sup> células (A375) o 5 x 10<sup>6</sup> células (HCT-116) en una mezcla 1:1 de medio y matrigel (0,2 ml de volumen total) por inyección subcutánea en la pata trasera de ratas hembra desnudas (NIH modelo N.º NIH-RNU-M de Taconic). Se usa un total de 8 ratas en cada grupo para el estudio de eficacia, y se usa un total de 3-4 ratas en cada grupo para un estudio farmacodinámico. El Eli Lilly and Company Animal Care and Use Committee aprobó todos los protocolos experimentales. El tratamiento se inicia con administración oral (sonda nasogástrica) del Ejemplo 1 o vehículo (Captisol® al 20%, fosfato 25 mM, pH 2,0) en un volumen de 0,6 ml cuando el tamaño del tumor alcanza aproximadamente 500 mg. El Ejemplo 1 se dosifica por vía oral dos veces al día a 5, 10, 15, y 20 mg/kg durante 21 días para el modelo de xenoinjerto A375, o 15 y 30 mg/kg durante 21 días para el modelo de xenoinjerto HCT-116. Se controla el crecimiento del tumor y el peso corporal en el tiempo para evaluar la actividad y signos de toxicidad. Se realizan mediciones bidimensionales de los tumores dos veces a la semana y se calculan los volúmenes del tumor basándose en una longitud a medio eje y anchura a medio eje. Los datos de volumen del tumor se transforman a una escala log para equilibrar la varianza en el tiempo y los grupos de tratamiento. Los datos log del volumen se analizan con un análisis de medidas repetidas bidireccional de la varianza por tiempo y tratamiento usando los procedimientos MIXED® en el software SAS® (versión 8.2). El modelo de correlación para las medidas repetidas es potencia espacial. Los grupos tratados se comparan con el grupo de control en cada punto temporal. El procedimiento MIXED® también se usa por separado para cada grupo de tratamiento para calcular las medias ajustadas y los errores típicos en cada punto temporal. Ambos análisis justifican la autocorrelación en cada animal y la pérdida de datos que sucede cuando los animales con tumores grandes se retiran del estudio de forma prematura. Las medias ajustadas y los errores típicos se representan para cada grupo de tratamiento frente al tiempo.

En los modelos de xenoinjerto A375 todos los grupos de dosis evidenciaron inhibición del crecimiento del tumor y regresión del crecimiento del tumor, y no hubo pérdida de peso corporal del animal en ninguno de estos grupos. En el modelo de xenoinjerto HCT-116, el grupo de 30 mg/kg mostró inhibición del crecimiento del tumor estadísticamente significativo. Estos datos evidencian actividad *in vivo* por el Ejemplo 1 y apoyan la correlación de los datos enzimáticos, de lisado celular y proliferación celular a una actividad *in vivo*.

En un estudio diferente para evaluar los efectos farmacodinámicos (PD) del Ejemplo 1 en el modelo de xenoinjerto A375, se realiza un estudio de una sola dosis con dosis que varían de 3,125 a 50 mg/kg.

5 Dos horas después del tratamiento de una sola dosis, se observan efectos PD dependientes de la dosis como se pone de manifiesto mediante análisis de transferencia de Western. Se observó inhibición de fosfo-MEK y fosfo-ERK en todos los grupos de dosis y 25 mg/kg eliminaba casi completamente las actividades fosfo-MEK y fosfo-ERK en este modelo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 que es 1-(3,3-dimetilbutil)-3-(2-fluoro-4-metil-5-(7-metil-2-(metilamino)pirido[2,3-d]pirimidin-6-il)fenil)urea en forma cristalina **caracterizado por** un patrón de difracción de polvo de rayos X que tiene picos característicos, en  $2\theta \pm 0,2$ , que aparece en 16,0 y uno o más de 6,9, 7,0, 18,2 y 23,2.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y polivinilpirrolidona-acetato de vinilo (PVP-VA).
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que PVP-VA es Kollidon® VA 64.
8. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en terapia.
9. El compuesto o sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 20 10. El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de tiroides, cáncer de ovario, melanoma, leucemia mielógena aguda (AML), y cáncer colorrectal.
11. El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el cáncer es melanoma.
12. El compuesto o sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el cáncer es cáncer colorrectal.

25

Fig. 1

