

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 379**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2013 PCT/US2013/036193**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO2013155317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2013 E 13774979 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2836491**

54 Título: **Forma de sal de un inhibidor de histona metiltransferasa EZH2 humana**

30 Prioridad:

13.04.2012 US 201261624215 P

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

16.06.2017

73 Titular/es:

**EPIZYME, INC. (50.0%)
400 Technology Square, 4th Floor
Cambridge, MA 02139, US y
EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KUNTZ, KEVIN, WAYNE;
HUANG, KUAN-CHUN;
CHOI, HYEONG, WOOK;
SANDERS, KRISTEN;
MATHIEU, STEVEN;
CHANDA, ARANI y
FANG, FRANK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 617 379 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

Forma de sal de un inhibidor de histona metiltransferasa EZH2 humana

Antecedentes de la invención

5 Se estima que más de 1,6 millones de personas serán diagnosticadas con cáncer en 2012, Por ejemplo, el tipo más común de cáncer en las mujeres es el cáncer de mama, y esta enfermedad es responsable de uno de los más altos índices de mortalidad entre todos los tipos de cáncer que afectan a las mujeres. El tratamiento actual del cáncer de mama se limita a la mastectomía total o parcial, la radioterapia o la quimioterapia. Casi 230.000 de los casos de cáncer en 2012 serán cáncer de mama, lo cual resultará en 40.000 muertes. Véase, Siegel et al., Ca Cancer J Clin 2012; 62:10-29,

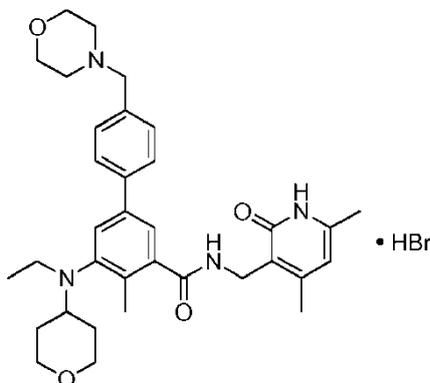
10 Un número de muertes por cáncer son causadas por cáncer de la sangre, incluidos leucemias, mielomas y linfomas. En 2012, prácticamente 80.000 de los casos de cáncer serán linfomas, lo que provocará aproximadamente 20.000 muertes.

15 La radioterapia, la quimioterapia y la cirugía son los métodos principales de tratamiento del cáncer. No obstante, estas terapias son exitosas principalmente solo cuando el cáncer se detecta en una etapa incipiente. Una vez que el cáncer alcanza las etapas invasivas/metastásicas, las líneas de células invasoras o metastásicas pueden escapar a la detección, provocando así recaídas que requieren el uso de terapia altamente tóxica. En este punto, tanto las células cancerosas como las células no afectadas del paciente se exponen a la terapia tóxica, lo que resulta, entre otras complicaciones, en un debilitamiento del sistema inmunológico.

20 Por lo tanto, permanece la necesidad en la técnica de nuevos métodos para tratar el cáncer, tal como el cáncer de mama o los linfomas, en un paciente.

Compendio de la invención

Por consiguiente, en este documento se da a conocer el hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida:



25 También se da a conocer en el presente documento una forma de polimorfismo particular de hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida ("Polimorfo A" o "Polimorfo A de hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida"). Como se describe en la presente invención, la sal de hidrobromuro descrita en este documento, así como también el Polimorfo A, exhiben propiedades físicas que pueden ser explotadas con el fin de obtener nuevas propiedades farmacológicas, y que pueden ser utilizadas en el desarrollo de sustancias farmacéuticas y fármacos.

30 En una realización, el hidrobromuro es cristalino. En otra realización, el hidrobromuro está sustancialmente libre de impurezas. En otra realización, el hidrobromuro es un sólido cristalino sustancialmente libre de hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida amorfo.

35 En otro aspecto, se da a conocer en este documento una composición farmacéutica que comprende el hidrobromuro anteriormente descrito, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 En un aspecto, el hidrobromuro anteriormente descrito se prepara usando un método que combina N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.

El polimorfismo A de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida se puede definir de acuerdo con su patrón de difracción de rayos X

por polvo. Por consiguiente, en una realización, el polimorfismo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados y aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados 2-teta. En otra realización, el polimorfismo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados y aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados 2-teta. Incluso en otra realización, el polimorfismo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. Incluso en otra realización, el polimorfismo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1. En otra realización, el polimorfismo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo sustancialmente de acuerdo con la Tabla 1.

El polimorfismo A también puede definirse de acuerdo con su termograma de calorimetría de barrido diferencial. En una realización, el polimorfismo exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial que tiene un pico característico expresado en unidades de °C a una temperatura de 255 +/- 5°C. En una realización, el polimorfismo exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial de acuerdo con la Figura 3,

En un aspecto, el Polimorfo A se prepara usando un método que comprende combinar N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.

En otro aspecto, se da a conocer en este documento un método para recrystalizar el Polimorfo A, que comprende las siguientes etapas: (a) disolver el Polimorfo A en un primer disolvente, y (b) añadir un segundo disolvente, de modo tal que dicho polimorfismo recrystalice. En una realización, el primer disolvente es etanol y el segundo disolvente es MTBE. En otra realización, el método comprende (a) disolver el Polimorfo A en etanol, (b) calentar la mezcla, (c) añadir MTBE a la mezcla, formar un precipitado que comprende dicho polimorfismo y filtrar el precipitado de modo tal que dicho polimorfismo recrystalice.

Incluso en otro aspecto, se da a conocer en este documento una composición farmacéutica que comprende el Polimorfo A y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en este documento un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de hidrobromuro anteriormente descrito, el Polimorfo A o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de estos compuestos. Se pueden tratar una diversidad de tipos de cáncer, incluidos linfoma no Hodgkin o cáncer de mama.

También se describe en este documento un método para inhibir la actividad de la histona metiltransferasa de EZH2 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de hidrobromuro anteriormente descrito, el Polimorfo A o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de estos compuestos.

Incluso en otro aspecto, se da a conocer en este documento un método para inhibir la actividad de la histona metiltransferasa de EZH2 *in vitro*, que comprende administrar el compuesto de hidrobromuro anteriormente descrito o el Polimorfo A.

Se da a conocer también en este documento el uso del compuesto de hidrobromuro anteriormente descrito, el Polimorfo A o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de estos compuestos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el patrón de difracción de rayos X por polvo del Polimorfo A (monohidrobromuro).

La Figura 2 ilustra el patrón de difracción de rayos X por polvo del dihidrobromuro del Compuesto

La Figura 3 ilustra el termograma de calorimetría de barrido diferencial del Polimorfo A.

La Figura 4 ilustra la sorción dinámica de vapor del Polimorfo A, que demuestra la baja higroscopicidad de este compuesto.

La Figura 5 ilustra el análisis HPLC del Polimorfo A durante tres días a una temperatura elevada. El Polimorfo A produjo impurezas mínimas durante este periodo.

La Figura 6 ilustra la sorción dinámica de vapor de la sal de sodio del Compuesto I, que demuestra la higroscopicidad significativa de este compuesto.

La Figura 7 ilustra la sorción dinámica de vapor de la sal hemisulfato del Compuesto I, que demuestra que este compuesto tiene higroscopicidad moderadamente alta.

La Figura 8 expone los datos de calorimetría de barrido diferencial de la sal monohidrocloruro del Compuesto I, que indica que este compuesto es escasamente cristalino.

La Figura 9 ilustra el patrón de difracción de rayos X por polvo del intermedio sintético 5.

La Figura 10 ilustra el patrón de difracción de rayos X por polvo del Polimorfo B.

5 La Figura 11 ilustra la estructura cristalina de rayos X del monohidrobromuro del Compuesto I.

Las Figuras 12-14 exponen los resultados de estudios *in vivo* del hidrobromuro del Compuesto I en una línea celular de linfoma humano.

Las Figuras 15-16 muestran el efecto antineoplásico del hidrobromuro del Compuesto I en un modelo de xenoinjerto de linfoma de ratón.

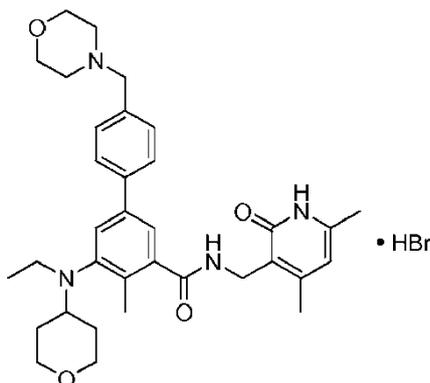
10 La Figura 17 ilustra el patrón de difracción de rayos X por polvo del intermedio sintético 2.

Las Figuras 18A y B ilustran (A) el patrón de difracción de rayos X por polvo de la sal trihidrocloruro del Compuesto I y (B) la sorción dinámica de vapor de la sal monohidruo del Compuesto I, que demuestra la higroscopicidad significativa de este compuesto.

Descripción detallada de la invención

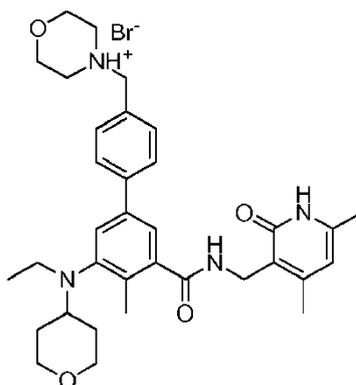
15 Forma de sal HBr y Forma de Polimorfo A

Se da a conocer en la presente invención el hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida:



20 [0021] Tal como se emplea en la presente memoria, "Compuesto I" se refiere a N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida. El hidrobromuro del Compuesto I se puede utilizar para inhibir la actividad de la histona metiltransferasa de EZH2, o bien en un sujeto o *in vitro*. El hidrobromuro del Compuesto I también se puede utilizar para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita.

25 El Compuesto I se puede protonar en uno o más de sus sitios básicos, tales como los restos morfolina, anilina disustituida y/o piridona. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se da a conocer en este documento el monohidrobromuro, dihidrobromuro o trihidrobromuro del Compuesto I. En una realización, se da a conocer en este documento el monohidrobromuro del Compuesto I. Cuando el compuesto es el monohidrobromuro, el compuesto se puede protonar en cualquier sitio básico. En una realización no limitativa, el Compuesto I se protona en el nitrógeno del sustituyente morfolino, proporcionando un monohidrobromuro del Compuesto I que tiene la siguiente estructura:



Este monohidrobromuro particular puede denominarse "bromuro de 4-((3'-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-5'-(etil(tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)morfolin-4-io". La Figura 11 ilustra la estructura cristalina de rayos X de esta forma de sal particular.

- 5 El hidrobromuro del Compuesto I posee una serie de propiedades físicas ventajosas frente a su forma base, así como también otras sales de la base libre. En particular, el hidrobromuro del Compuesto I posee baja higroscopicidad en comparación con otras formas de sal del Compuesto I. Para que un compuesto sea eficaz en una terapia, en general se requiere que el compuesto sea mínimamente higroscópico. Las formas de fármaco que son altamente higroscópicas pueden ser inestables, ya que la velocidad de disolución de la forma de fármaco puede cambiar a medida que se conserva en entornos con humedad variable. A su vez, la higroscopicidad puede impactar en el manipuleo y la fabricación a gran escala de un compuesto, ya que puede ser difícil determinar el peso verdadero de un agente activo higroscópico al preparar una composición farmacéutica que comprenda ese agente. El hidrobromuro del Compuesto I tiene baja higroscopicidad en comparación con otras formas de sal del Compuesto I. Como tal, puede almacenarse durante periodos considerables, y no sufrir cambios nocivos en, por ejemplo, solubilidad, densidad o incluso composición química.

Además de las ventajas anteriores, el hidrobromuro del Compuesto I puede producirse en una forma altamente cristalina, que es útil en la preparación de formulaciones farmacéuticas, y suele mejorar el manipuleo, la manipulación y el almacenamiento en general del compuesto de fármaco. En una realización preferida, la forma cristalina del hidrobromuro del Compuesto I es en una forma que se denomina "Polimorfo A".

- 20 La capacidad de una sustancia de existir en más de una forma cristalina se define como polimorfismo, las distintas formas cristalinas de una sustancia particular se denominan "polimorfos". En general, el polimorfismo está afectado por la capacidad de una molécula de una sustancia de cambiar su conformación o de formar distintas interacciones intermoleculares o intra-moleculares, particularmente enlaces hidrógeno, que se refleja en diferentes configuraciones atómicas en las matrices cristalinas de los distintos polimorfos. En contraste, la forma externa general de una sustancia se conoce como "morfología", la cual refleja la forma externa del cristal y los planos presentes, sin referencia a la estructura interna. Los cristales pueden exhibir diferente morfología en función de diferentes condiciones, tales como, por ejemplo, índice de crecimiento, agitación y presencia de impurezas.

- 30 Los diferentes polimorfos de una sustancia pueden poseer distintas energías de la matriz cristalina y, por lo tanto, en estado sólido pueden demostrar distintas propiedades físicas tales como forma, densidad, punto de fusión, color, estabilidad, solubilidad, velocidad de disolución, etc., que puede, a su vez, afectar la estabilidad, velocidad de disolución y/o biodisponibilidad de un polimorfo determinado y su adecuación para uso como producto farmacéutico y en composiciones farmacéuticas.

El Polimorfo A es altamente cristalino y exhibe baja higroscopicidad. Además, este polimorfo se puede obtener en forma reproducible, y ligeros cambios en las condiciones de cristalización no producen formas cristalinas diferentes.

- 35 Es conveniente el acceso a diferentes polimorfos del hidrobromuro del Compuesto I por una serie de motivos. Uno de ellos que los polimorfos individuales pueden incorporar distintas impurezas, o residuos químicos, tras la cristalización. Por ejemplo, las impurezas pueden eliminarse durante el proceso de convertir el Compuesto I en el Polimorfo A.

- 40 Sin desear estar influenciados por la teoría, las formas polimorfas que exhiben formas cristalinas compactas poseen ventajas en términos de facilidad de filtración y facilidad de flujo. El Polimorfo A exhibe una forma cristalina compacta que por lo tanto posee estas ventajas.

- 45 En determinadas realizaciones, el Polimorfo A es identificable en función de los picos característicos en un análisis de difracción de rayos X por polvo. La difracción de rayos X por polvo, también denominada XRPD, es una técnica científica que usa difracción de rayos X, neutrones o electrones en polvo, materiales microcristalinos u otros materiales sólidos para caracterización estructural de los materiales. En una realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-teta a

aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados y aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados 2-teta. En otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados y aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados 2-teta.

- 5 En una realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 5 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 6 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. Incluso en otra realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 7 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 8 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados, 23,6 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. Incluso en otra realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 9 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. Incluso en otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 10 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.

Incluso en otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 14,3 +/- 0,3 grados, aproximadamente 18,7 +/- 0,3 grados, aproximadamente 23,3 +/- 0,3 grados y aproximadamente 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.

Incluso en otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 10,1 +/- 0,3 grados, aproximadamente 14,3 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados, aproximadamente 18,7 +/- 0,3 grados, aproximadamente 20,6 +/- 0,3 grados, aproximadamente 20,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 21,8 +/- 0,3 grados, aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados, aproximadamente 23,3 +/- 0,3 grados y aproximadamente 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta. Incluso en otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1, En otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo sustancialmente de acuerdo con los valores 2-teta enumerados en la Tabla 1,

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor de grados 2-teta, se refiere a un valor establecido +/- 0,3 grados 2-teta.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el Polimorfo A se pueden identificar por comparación de los patrones de difracción de rayos X por polvo de las composiciones con un patrón de difracción de rayos X por polvo del Polimorfo A. Se ha de apreciar que las composiciones farmacéuticas que comprenden el Polimorfo A pueden exhibir patrones de difracción de rayos X por polvo no idénticos en comparación con un patrón de difracción de rayos X por polvo del Polimorfo A puro.

En determinadas realizaciones, el Polimorfo A es identificable en función de un pico característico observado en un termograma de calorimetría de barrido diferencial. La calorimetría de barrido diferencial, o DSC, es una técnica termoanalítica en la que la diferencia en la cantidad de calor requerida para incrementar la temperatura de una muestra y la referencia se mide como una función de temperatura. En una realización, el Polimorfo A exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial que tiene un pico característico expresado en unidades de °C a una temperatura de aproximadamente 255 +/- 5°C. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial que tiene un solo pico endotérmico observado en el intervalo de temperatura de 250-255°C. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial sustancialmente de acuerdo con la Figura 3,

En determinadas realizaciones, el Polimorfo A puede contener impurezas. Los ejemplos no limitativos de impurezas incluyen formas polimorfas no deseadas, o moléculas orgánicas e inorgánicas residuales tales como disolventes, agua o sales. En una realización, el Polimorfo A está sustancialmente libre de impurezas. En otra realización, el Polimorfo A contiene menos de 10% en peso de impurezas totales. En otra realización, el Polimorfo A contiene menos de 5% en peso de impurezas totales. En otra realización, el Polimorfo A contiene menos de 1% en peso de impurezas totales. Incluso en otra realización, el Polimorfo A contiene menos de 0,1% en peso de impurezas totales.

En determinadas realizaciones, el Polimorfo A es un sólido cristalino sustancialmente libre del hidrobromuro del Compuesto I amorfo. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "sustancialmente libre del hidrobromuro del Compuesto I amorfo" significa que el compuesto no contiene cantidades significativas del hidrobromuro del Compuesto I amorfo. En determinadas realizaciones, está presente por lo menos aproximadamente 95% en peso del Polimorfo A cristalino. Incluso en otras realizaciones de la invención, está presente por lo menos aproximadamente 99% en peso del Polimorfo A cristalino.

En otra realización, el Polimorfo A está sustancialmente libre del Polimorfo B.

La sal de la invención, y su forma cristalina del Polimorfo A, se pueden hallar junto con otras sustancias o se pueden aislar. En algunas realizaciones, la sal de la invención, o su forma cristalina, está sustancialmente aislada. Por "sustancialmente aislada" se entiende que la sal o su forma cristalina está por lo menos parcialmente o sustancialmente separada del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en la sal de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 97% o por lo menos aproximadamente 99% en peso del hidrobromuro del Compuesto I y el Polimorfo A. Los métodos para aislar compuestos y sus sales son habituales en la técnica.

Tanto el hidrobromuro del Compuesto I como el Polimorfo A pueden ocurrir como cualquier tautómero razonable, o una mezcla de tautómeros razonables. Tal como se emplea en la presente memoria, "tautómero" hace referencia a uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra. Los ejemplos incluyen tautómeros de ceto-enol, tales como acetona/propen-2-ol, y similares. El hidrobromuro del Compuesto I y el Polimorfo A pueden tener uno o más tautómeros y por ende incluyen diversos isómeros, es decir, piridin-2(1H)-ona y el correspondiente piridin-2-ol. Todas las formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención.

Preparación de la forma de sal HBr y el Polimorfo A

El hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A, pueden prepararse usando técnicas conocidas. Convencionalmente, se prepara una forma de sal combinando en disolución el compuesto de base libre y un ácido que contiene el anión de la forma de sal deseada, y luego aislando el producto de sal sólido a partir de la disolución de reacción (p. ej., cristalización, precipitación, evaporación, etc.). Se pueden emplear otras técnicas formadoras de sales.

El Esquema 1 a continuación señala una realización particular para la producción de la base libre del Compuesto I, así como también el hidrobromuro del Compuesto I. En síntesis, se somete a reacción 3-amino-5-bromo-2-metilbenzoato de metilo (1) con dihidro-2H-piran-4(3H)-ona bajo condiciones de aminación reductora para formar 5-bromo-2-metil-3-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)benzoato de metilo (2) en la etapa 1, En la etapa 2, se usa nuevamente la aminación reductora para formar 5-bromo-3-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-2-metilbenzoato (3). Este compuesto luego se somete a reacción bajo condiciones de acoplamiento Suzuki en la etapa 3 para formar 5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de metilo (4), que se hidroliza al correspondiente ácido (5) en la etapa 4. En la etapa 5, se somete a reacción ácido (5) bajo condiciones de reacción de acoplamiento de amida con hidrocloreto de 3-(aminometil)-4,6-dimetil-dihidro-piridin-2(1H)-ona para formar el Compuesto I.

Como se muestra, el Compuesto I puede luego someterse a reacción con HBr acuoso para formar el hidrobromuro del Compuesto I.

5 etilo, alcohol isopropílico/agua y acetato de etilo, tetrahidrofurano/agua y acetato de etilo, acetona y acetato de etilo, acetónitrilo/agua y acetato de etilo, etanol/agua y éter metil terc-butílico, alcohol isopropílico/agua y éter metil terc-butílico, etanol/agua y tetrahidrofurano, alcohol isopropílico/agua y acetona, y etanol/agua y acetato de etilo. En realizaciones particulares, las combinaciones de disolvente son metanol/agua y acetato de etilo, alcohol isopropílico/agua y acetato de etilo, etanol/agua y 2-metiltetrahidrofurano, y metanol/2-metiltetrahidrofurano.

En un aspecto, el Polimorfo A se prepara utilizando un método que comprende combinar N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.

10 En otro aspecto, se da a conocer en este documento un método para recrystalizar el Polimorfo A, que comprende las siguientes etapas: (a) disolver el Polimorfo A en un primer disolvente, y (b) añadir un segundo disolvente, de modo tal que dicho polimorfo se recrystalice. En una realización, el primer disolvente es etanol, y el segundo disolvente es MTBE. En otra realización, el método comprende (a) disolver el Polimorfo A en etanol, (b) calentar la mezcla, (c) añadir MTBE a la mezcla, formar un precipitado que comprende dicho polimorfo y filtrar el precipitado de modo tal que dicho polimorfo se recrystalice.

15 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, se da a conocer en la presente invención una composición farmacéutica que comprende el hidrobromuro del Compuesto I, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. También se da a conocer en este documento una composición farmacéutica que comprende el Polimorfo A, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 La expresión "composición farmacéutica" incluye preparaciones adecuadas para administración a mamíferos, p. ej., seres humanos. Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos a mamíferos, p. ej., seres humanos, pueden administrarse per se o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1% a 99,9% (más preferiblemente, 0,5 a 90%) de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Los compuestos descritos en este documento (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I y el Polimorfo A) se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas adecuadas de combinación de productos farmacéuticos. Tal como se emplea en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede incluir todos y cada uno de los disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes activos superficiales, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma farmacéutica deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) describe diversos vehículos empleados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto que algún medio de vehículo convencional sea incompatible con los compuestos, en el sentido de producir un efecto biológico indeseable u otra forma de interacción perjudicial con cualquier otro componente(s) de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de la presente invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitarse a ello, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como mantequilla de cacao y ceras de supositorio; aceites tales como aceite de cacahuate, aceite de algodón; aceite de cártamo, aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol; ésteres tales como etil oleato y etil laurato; agar; agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico y disoluciones tampón de fosfato, así como también otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, además de colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saporíferos y perfumantes, conservantes y antioxidantes que también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

50 Asimismo, el vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la preparación deseada para administración, p. ej., oral, nasal, rectal, vaginal, parenteral (incluidas infusiones o inyecciones intravenosas). En la preparación de composiciones para presentación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Los medios farmacéuticos habituales incluyen, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, saporíferos, conservantes, colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como por ejemplo suspensiones, disoluciones, emulsiones y elixires); aerosoles; o vehículos tales como almidón, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, desintegrantes y similares, en el caso de preparaciones orales (tales como por ejemplo polvos, cápsulas y comprimidos).

Los agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, además de colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saporíferos y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden también estar presentes en las composiciones.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: agua antioxidantes solubles, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, tocoferoles y similares; y agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos se pueden formular para tener cualquier concentración deseada. En algunas realizaciones, la composición se formula de manera tal que comprenda por lo menos una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la composición se formula de manera tal que comprenda una cantidad que no causaría uno o más efectos colaterales indeseados.

Dado que la forma cristalina del hidrobromuro del Compuesto I se mantiene más fácilmente durante su preparación, las presentaciones sólidas son una forma preferida para la composición farmacéutica de la invención. Las presentaciones sólidas para administración oral, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos, se prefieren particularmente. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir por técnicas conocidas en el campo.

Las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, sublingual, nasal, rectal, vaginal, tópica, bucal y parenteral (incluidas subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la ruta más adecuada dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que se esté tratando. Las composiciones pueden presentarse convenientemente en presentaciones unitarias, y prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de farmacia. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral en la forma de una pastilla, cápsula, gragea o comprimido. En otras realizaciones, la composición farmacéutica tiene la forma de una suspensión.

Los compuestos que se dan a conocer en la presente invención son adecuados como agentes activos en composiciones farmacéuticas que son particularmente eficaces para tratar trastornos asociados con EZH2, especialmente cáncer. La composición farmacéutica en diversas realizaciones tiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del hidrobromuro del Compuesto I o el Polimorfo A, junto con otros excipientes, vehículos, cargas, diluyentes y similares farmacéuticamente aceptables.

Una "cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz" es una cantidad de un compuesto (el hidrobromuro del Compuesto I o el Polimorfo A), que cuando se administra a un paciente, alivia un síntoma de una enfermedad o dolencia, p. ej., previene los diversos síntomas morfológicos y somáticos del cáncer. En un ejemplo, una cantidad eficaz del hidrobromuro del Compuesto I o el Polimorfo A es la cantidad suficiente para tratar el cáncer en un sujeto. La cantidad puede variar dependiendo de factores tales como la talla y el peso del sujeto, el tipo de enfermedad o el compuesto particular de la invención. La cantidad del hidrobromuro del Compuesto I o el Polimorfo A que constituye una "cantidad eficaz" variará dependiendo del compuesto, la patología y su gravedad, la edad del paciente que se ha de tratar y similares. El experto en la técnica puede determinar de manera rutinaria la cantidad eficaz, teniendo en cuenta sus conocimientos y la presente descripción.

El esquema de administración puede afectar lo que constituye una cantidad farmacéuticamente eficaz. El hidrobromuro del Compuesto I o el Polimorfo A, y las composiciones que comprenden alguno de estos compuestos, se pueden administrar al sujeto o bien antes o después del inicio de una enfermedad. A su vez, se pueden administrar varias dosis divididas, así como también dosis escalonadas a diario o secuencialmente, o la dosis se puede infundir continuamente, o puede ser una inyección en bolo. Además, las dosis pueden incrementarse o reducirse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

Métodos de tratamiento

Los compuestos de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) inhiben la actividad de la histona metiltransferasa de EZH2 o su mutante y, por consiguiente, en un aspecto de la invención, ciertos compuestos descritos en este documento son candidatos para uso en el tratamiento o la prevención de ciertas condiciones y enfermedades. La presente descripción da a conocer métodos para tratar condiciones y enfermedades cuyo curso puede estar influenciado por la modulación del estado de metilación de las histonas u otras proteínas, en donde dicho estado de metilación es mediado al menos en parte por la actividad de EZH2. La modulación del estado de metilación de las histonas a su vez influencia el nivel de expresión de genes diana activados por metilación, y/o genes diana suprimidos por metilación. El método incluye administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.

El trastorno en el que la metilación de la proteína mediada por EZH2 cumple una función puede ser cáncer o una afección pre-cancerosa. La presente invención da a conocer también el uso de un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) en el tratamiento del cáncer o pre-cáncer, cuyo curso se puede influenciar modulando la metilación de la proteína mediada por EZH2 o, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de dicho cáncer o pre-cáncer. Los tipos de cáncer ilustrativos que se pueden tratar incluyen linfomas, incluido linfoma no Hodgkin, linfoma folicular (FL) y linfoma difuso de células grandes B (DLBCL); melanoma; y leucemia, incluida CML. La afección pre-cancerosa ilustrativa incluye síndrome mielodisplásico (MDS; antes conocido como pre-leucemia).

Incluso en otra realización, se describe en este documento un método para tratar un linfoma que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del hidrobromuro del Compuesto I.

Incluso en otra realización, se describe en este documento un método para tratar un linfoma, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz del Polimorfo A.

5 La presente descripción también da a conocer métodos para proteger contra un trastorno en el que la metilación de proteínas mediada por EZH2 cumple una función en un sujeto que lo necesita, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) a un sujeto que necesita dicho tratamiento. El trastorno puede ser cáncer, p. ej., cáncer en el que la metilación de proteínas mediada por EZH2 cumple una función. La presente invención también
10 da a conocer el uso de un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) para la preparación de un medicamento útil para la prevención de un trastorno proliferativo celular asociado, por lo menos en parte, con la metilación de proteínas mediada por EZH2.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para modular la metilación de proteínas (p. ej., histona), p. ej., para modular la actividad de la enzima histona metiltransferasa o histona desmetilasa. Por lo menos algunos de los compuestos de la invención se pueden emplear *in vivo* o *in vitro* para modular la metilación de proteínas. Se ha descrito que la metilación de histona está implicada en la expresión aberrante de ciertos genes en cáncer, y en el silenciamiento de genes neuronales en células no neuronales. Por lo menos algunos compuestos descritos en este documento son candidatos adecuados para tratar estas enfermedades, es decir, para reducir la metilación o restaurar la metilación hasta aproximadamente su nivel en células normales equivalentes.

20 Se pueden emplear compuestos que son moduladores de metilación para modular la proliferación celular. Por ejemplo, en algunos casos, la proliferación excesiva se puede reducir con agentes que disminuyen la metilación, mientras que la proliferación insuficiente se puede estimular con agentes que incrementan la metilación. Por consiguiente, las enfermedades que se pueden tratar con los compuestos de la invención pueden incluir enfermedades hiperproliferativas, tales como desarrollo de células benignas y desarrollo de células malignas.

25 Tal como se emplea en la presente memoria, un "sujeto que lo necesita" es un sujeto que tiene un trastorno en el que la metilación de proteínas mediada por EZH2 cumple una función, o un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar un trastorno en relación con la población general. Un sujeto que lo necesita puede tener una afección pre-cancerosa. Preferiblemente, un sujeto que lo necesita padece cáncer. Un "sujeto" incluye a un mamífero. El mamífero puede ser, p. ej., un mamífero humano u otro no humano adecuado, tal como un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cabra, camello, oveja o cerdo. El sujeto puede ser también un pájaro o ave. En una
30 realización, el mamífero es un ser humano.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "trastorno proliferativo de las células" hace referencia a afecciones en las cuales el crecimiento desregulado o anormal, o ambos, de las células, puede provocar el desarrollo de una afección o enfermedad no deseada, que puede ser o no cancerosa. Los trastornos proliferativos de las células ilustrativos que se pueden tratar con los compuestos de la invención abarcan una diversidad de afecciones en las que la división celular está desregulada. Los trastornos proliferativos de las células ilustrativos incluyen, aunque sin limitarse a ello, neoplasias, tumores benignos, tumores malignos, condiciones pre-cancerosas, tumores *in situ*, tumores encapsulados, tumores metastásicos, tumores líquidos, tumores sólidos, tumores inmunológicos, tumores hematológicos, cáncer, carcinomas, leucemias, linfomas, sarcomas y células en proceso de división rápida. La expresión "célula en proceso de división rápida", tal como se emplea en la presente memoria, se define como cualquier célula que se divide a una velocidad que excede o es mayor que aquella esperada u observada entre células aledañas o yuxtapuestas dentro del mismo tejido. Un trastorno proliferativo de las células incluye una afección pre-cancerosa. Un trastorno proliferativo de las células incluye cáncer. En un aspecto, los métodos que se dan a conocer en este documento se usan para tratar o mejorar un síntoma de cáncer o para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. El término "cáncer" incluye tumores sólidos, así como también tumores hematológicos y/o malignidades. Una "célula pre-cancerosa" es una célula que manifiesta un trastorno proliferativo de las células que es una afección pre-cancerosa. Una "célula de cáncer" o "célula cancerosa" es una célula que manifiesta un trastorno proliferativo de las células que es un cáncer. Se puede emplear cualquier medio reproducible de medición para identificar células de cáncer o células pre-cancerosas. Las células cancerosas o las células pre-cancerosas se pueden identificar mediante tipificación o clasificación histológica de muestras de tejido (p. ej., una muestra de biopsia). Las células cancerosas o las células pre-cancerosas se pueden identificar a través del uso de marcadores moleculares apropiados.

Las afecciones o trastornos no cancerosos ilustrativos que se pueden tratar usando uno o más compuestos de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, artritis reumatoidea, inflamación; enfermedad autoinmune; afecciones linfoproliferativas; acromegalia; espondilitis reumatoidea; artrosis; gota, otras afecciones artríticas; septicemia; choque septicémico; choque endotóxico; septicemia gramnegativa; síndrome de choque tóxico; asma; síndrome de dificultad respiratoria aguda; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; inflamación pulmonar crónica; enfermedad inflamatoria de los intestinos; enfermedad de Crohn; psoriasis; eczema; colitis ulcerosa; fibrosis pancreática; fibrosis hepática; enfermedad renal aguda y crónica; síndrome del intestino irritable; piresis; restenosis; paludismo cerebral; accidente cerebrovascular y lesión isquémica; traumatismo neuronal; enfermedad de Alzheimer;

enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor agudo y crónico; rinitis alérgica; conjuntivitis alérgica; insuficiencia cardíaca crónica; síndrome coronario agudo; caquexia; paludismo; lepra; leishmaniasis; enfermedad de Lyme; síndrome de Reiter; sinovitis aguda; degeneración macular, bursitis; tendinitis; tenosinovitis; hernia de disco o síndrome de prolapso del disco intervertebral; osteopetrosis; trombosis; restenosis; silicosis; sarcoidosis pulmonar; enfermedades de resorción ósea, tales como osteoporosis; reacción de injerto frente a hospedante; esclerosis múltiple; lupus; fibromialgia; sida y otras enfermedades víricas tales como Herpes Zóster, Herpes Simple I o II, virus de la gripe y citomegalovirus; y diabetes mellitus.

Los tipos de cáncer ilustrativos que se pueden tratar usando uno o más compuestos de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, carcinoma adrenocortical, cáncer relacionado con el sida, linfoma relacionado con el sida, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer del apéndice, atrocioma cerebelar infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de huesos y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor de cerebro, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de las vías visuales e hipotalámico, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoideo, cáncer gastrointestinal, del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervical, cáncer en niños, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de células T cutáneas, neoplasias linfoides, micosis fungoides, síndrome de Sezary, cáncer endometrial, cáncer de esófago, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoideo gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumor de células germinales de ovario, glioma trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células vellosas, cáncer de labio y de la cavidad bucal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma relacionado con el sida, linfoma no Hodgkin, sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, cáncer de la boca, cáncer de la lengua, síndrome de neoplasias endocrinas múltiples, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/ mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad bucal, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno, cáncer pancreático, cáncer de islotes pancreáticos, cáncer de la cavidad nasal y los senos paranasales, cáncer paratiroideo, cáncer peniano, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor pituitario, neoplasma celular/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, familia Ewing de tumores sarcoma, sarcoma Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel de células merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de testículo, cáncer de garganta, timoma, carcinoma de timoma y tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y del uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer uretral, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino, cáncer del cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar y tumor de Wilm.

Un "trastorno proliferativo de las células del sistema hematológico" es un trastorno proliferativo de las células que implica células del sistema hematológico. Un trastorno proliferativo de las células del sistema hematológico puede incluir linfoma, leucemia, neoplasias mieloides, neoplasias de mastocitos, mielodisplasia, gamopatía monoclonal benigna, granulomatosis linfomatoide, papulosis linfomatoide, policitemia vera, leucemia mielocítica crónica, metaplasia mieloide agnógena y trombocitopenia esencial. Un trastorno proliferativo de las células del sistema hematológico puede incluir hiperplasia, displasia y metaplasia de las células del sistema hematológico. En un aspecto, las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un cáncer hematológico de la presente invención o un trastorno proliferativo de las células hematológico de la presente invención, o se pueden usar para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. Un cáncer hematológico de la presente invención puede incluir mieloma múltiple, linfoma (incluido linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfomas en niños y linfomas de origen linfocítico y cutáneo), leucemia (incluida leucemia en niños, leucemia de células vellosas, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de mastocitos), neoplasias mieloides y neoplasias de mastocitos.

Un "trastorno proliferativo de las células del pulmón" es un trastorno proliferativo de las células que implica células del pulmón. Los trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir todas las formas de trastornos

proliferativos de las células que afecten a las células pulmonares. Los trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir cáncer de pulmón o una afección pre-cancerosa del pulmón, tumores o lesiones benignas del pulmón y tumores o lesiones malignas del pulmón, y lesiones metastásicas en tejido y órganos en otra parte del cuerpo que no sea el pulmón. En un aspecto, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar cáncer de pulmón o trastornos proliferativos de las células del pulmón, o utilizarse para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. El cáncer de pulmón puede incluir todas las formas de cáncer del pulmón. El cáncer de pulmón puede incluir neoplasias de pulmón malignas, carcinoma *in situ*, tumores carcinoides típicos y tumores carcinoides atípicos. El cáncer de pulmón puede incluir cáncer de pulmón de células pequeñas ("SCLC"), cáncer de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC"), carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células grandes, carcinoma de células adenoescamosas y mesotelioma. El cáncer de pulmón puede incluir "carcinoma cicatricial", carcinoma broncoalveolar, carcinoma de células gigantes, carcinoma de células fusiformes y carcinoma neuroendocrino de células grandes. El cáncer de pulmón puede incluir neoplasias pulmonares que tienen heterogeneidad ultraestructural e histológica (p. ej., tipo de células mixtas).

Los trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos de las células que afecten a las células del pulmón. Los trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir cáncer de pulmón, afecciones pre-cancerosas del pulmón. Los trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia del pulmón. Los trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir hiperplasia inducida por amianto, metaplasia escamosa y metaplasia mesotelial reactiva benigna. Los trastornos de células proliferativas del pulmón pueden incluir el reemplazo del epitelio de la columna con epitelio escamoso estratificado y displasia mucosa. Los individuos expuestos a agentes ambientales perjudiciales inhalados tales como el humo del cigarrillo y el amianto pueden conllevar mayor riesgo de desarrollar trastornos proliferativos de las células del pulmón. Enfermedades pulmonares previas que pueden predisponer a los individuos al desarrollo de trastornos proliferativos de las células del pulmón pueden incluir enfermedad pulmonar intersticial crónica, enfermedad pulmonar necrotizante, esclerodermia, enfermedad reumatoidea, sarcoidosis, neumonitis intersticial, tuberculosis, neumonías repetidas, fibrosis pulmonar idiopática, granuloma, amiantosis, alveolitis fibrosante y enfermedad de Hodgkin.

Un "trastorno proliferativo de las células del colon" es un trastorno proliferativo de las células del colon. Preferiblemente, el trastorno proliferativo de las células del colon es cáncer de colon. En un aspecto, las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar cáncer de colon o trastornos proliferativos de las células del colon, o se pueden usar para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. El cáncer de colon puede incluir todas las formas de cáncer de colon. El cáncer de colon puede incluir cáncer de colon esporádico y hereditario. El cáncer de colon puede incluir neoplasias de colon malignas, carcinoma *in situ*, tumores carcinoides típicos y tumores carcinoides atípicos. El cáncer de colon puede incluir adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células adenoescamosas. El cáncer de colon puede asociarse con un síndrome hereditario seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal no polipósico hereditario, poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Gardner, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Turcot y poliposis juvenil. El cáncer de colon puede ser causado por un síndrome hereditario seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal no polipósico hereditario, poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Gardner, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Turcot y poliposis juvenil.

Los trastornos proliferativos de las células del colon pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos de las células que afectan a las células del colon. Los trastornos proliferativos de las células del colon pueden incluir cáncer de colon, afecciones pre-cancerosas del colon, pólipos adenomatosos del colon y lesiones metacrónicas del colon. Un trastorno proliferativo de las células del colon puede incluir adenoma. Los trastornos proliferativos de las células del colon se pueden caracterizar por hiperplasia, metaplasia y displasia del colon. Las enfermedades de colon previas que pueden predisponer a los individuos al desarrollo de trastornos proliferativos de las células del colon pueden incluir cáncer de colon anterior. La enfermedad actual que puede predisponer a los individuos al desarrollo de trastornos proliferativos de las células del colon puede incluir enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Un trastorno proliferativo de las células del colon pueden asociarse con una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en p53, *ras*, *FAP* y *DCC*. Un individuo puede tener un riesgo elevado de desarrollar un trastorno proliferativo de las células del colon debido a la presencia de una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en p53, *ras*, *FAP* y *DCC*.

Un "trastorno proliferativo de las células del páncreas" es un trastorno proliferativo de las células que implica a las células del páncreas. Los trastornos proliferativos de las células del páncreas pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos de las células que afectan a las células pancreáticas. Los trastornos proliferativos de las células del páncreas pueden incluir cáncer de páncreas, un pre-cáncer o una afección pre-cancerosa del páncreas, hiperplasia del páncreas y displasia del páncreas, tumores o lesiones benignas del páncreas y tumores o lesiones malignas del páncreas y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo distintos del páncreas. El cáncer pancreático incluye todas las formas de cáncer de páncreas. El cáncer pancreático puede incluir adenocarcinoma ductal, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células gigantes pleomórficas, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células gigantes tipo osteoclastos, quisteadenocarcinoma mucinoso, carcinoma acinar, carcinoma de células grandes no clasificadas, carcinoma de células pequeñas, pancreatoblastoma, neoplasia papilar, quisteadenoma mucinoso, neoplasia quística papilar y quisteadenoma seroso. El cáncer pancreático puede también

incluir neoplasias pancreáticas que tienen heterogeneidad histológica y ultraestructural (p. ej., tipos de células mixtas).

5 Un "trastorno proliferativo de las células de la próstata" es un trastorno proliferativo de las células que implica a las células de la próstata. Los trastornos proliferativos de las células de la próstata pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos de las células que afectan a las células de la próstata. Los trastornos proliferativos de las células pueden incluir cáncer de próstata, un pre-cáncer o afección pre-cancerosa de la próstata, tumores o lesiones benignas de la próstata y tumores o lesiones malignas de la próstata, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo distintos de la próstata. Los trastornos de las células proliferativas de la próstata pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de la próstata.

10 Un "trastorno proliferativo de las células de la piel" es un trastorno proliferativo de las células que implica a las células de la piel. Los trastornos proliferativos de las células de la piel pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos de las células que afectan a las células de la piel. Los trastornos proliferativos de las células de la piel pueden incluir una afección pre-cancerosa de la piel, tumores o lesiones benignas de la piel, melanoma, melanoma maligno y otros tumores o lesiones malignas de la piel, y lesiones metastásicas en tejidos y órganos del cuerpo que no sean la piel. Los trastornos proliferativos de las células pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de la piel.

15 Un "trastorno proliferativo de las células del ovario" es un trastorno proliferativo de las células que implica a las células del ovario. Los trastornos proliferativos de las células del ovario pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos de las células que afectan a las células del ovario. Los trastornos proliferativos de las células del ovario pueden incluir una afección pre-cancerosa del ovario, tumores o lesiones benignas del ovario, cáncer de ovario, tumores o lesiones malignas y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo distintos del ovario. Los trastornos proliferativos de las células de la piel pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de células del ovario.

20 Un "trastorno proliferativo de las células de la mama" es un trastorno proliferativo de las células que implica a las células de la mama. Los trastornos proliferativos de las células de la mama pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos que afectan a las células de la mama. Los trastornos proliferativos de las células de la mama pueden incluir cáncer de mama, una afección pre-cancerosa de la mama, tumores o lesiones benignas de la mama y tumores o lesiones malignas de la mama, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo distintos de la mama. Los trastornos de las células proliferativas de la mama pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de la mama.

25 Un trastorno proliferativo de las células de la mama puede ser una afección pre-cancerosa de la mama. Las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar una afección pre-cancerosa de la mama. Una afección pre-cancerosa de la mama puede incluir hiperplasia atípica de la mama, carcinoma ductal *in situ* (DCIS), carcinoma intraductal, carcinoma lobular *in situ* (LCIS), neoplasia lobular y tumor o lesión de la mama de estadio 0 o grado 0 (p. ej., cáncer de mama de estadio 0 o grado 0, o carcinoma *in situ*). Una afección pre-cancerosa de la mama se puede clasificar de acuerdo con el esquema de clasificación TNM aceptado por el Comité Estadounidense Conjunto del Cáncer (American Joint Committee on Cancer o AJCC), en donde al tumor primario (T) se le ha asignado un estadio de T0 o Tis; y donde a los ganglios linfáticos regionales (N) se les ha asignado un estadio de N0; y en donde a la metástasis distante (M) se le ha asignado un estadio de M0.

30 El trastorno proliferativo de las células de la mama puede ser cáncer de mama. En un aspecto, las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar cáncer de mama, o se pueden usar para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. El cáncer de mama puede incluir todas las formas de cáncer de mama. El cáncer de mama puede incluir cáncer de mama epitelial primario. El cáncer de mama puede incluir cáncer en el que la mama esté comprometida por otros tumores tales como linfoma, sarcoma o melanoma. El cáncer de mama puede incluir carcinoma de la mama, carcinoma ductal de la mama, carcinoma lobular de la mama, carcinoma no diferenciado de la mama, cistosarcoma filoides de la mama, angiosarcoma de la mama y linfoma primario de la mama. El cáncer de mama puede incluir cáncer de mama de Estadio I, II, IIIA, IIIB, IIIC y IV. El carcinoma ductal de la mama puede incluir carcinoma invasivo, carcinoma invasivo *in situ* con componente intraductal predominante, cáncer de mama inflamatorio y un carcinoma ductal de la mama con un tipo histológico seleccionado del grupo que consiste en comedo, mucinoso (coloide), medular, medular con infiltrado linfocítico, papilar, cirroso y tubular. El carcinoma lobular de la mama puede incluir carcinoma lobular invasivo con componente predominante *in situ*, carcinoma lobular invasivo y carcinoma lobular infiltrante. El cáncer de mama puede incluir enfermedad de Paget, enfermedad de Paget con carcinoma intraductal y enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasivo. El cáncer de mama puede incluir neoplasias de mama que tienen heterogeneidad histológica y ultraestructural (p. ej., tipos de células mixtas).

35 Los compuestos de la presente invención se pueden usar para tratar cáncer de mama, o se pueden usar para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir cáncer de mama familiar. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir cáncer de mama esporádico. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede ocurrir en un sujeto de sexo masculino. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede ocurrir en un sujeto de sexo femenino. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede ocurrir en un

5 sujeto de sexo femenino pre-menopáusico o en un sujeto femenino post-menopáusico. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede ocurrir en un sujeto de 30 años de edad o más, o en un sujeto de 30 años de edad o menos. Un cáncer de mama que se ha de tratar ocurre en un sujeto de 50 años o más, o en un sujeto de 50 años o menos. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede ocurrir en un sujeto de 70 años o más o en un sujeto de 70 años o menos.

10 Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse para identificar una mutación familiar o espontánea en BRCA1, BRCA2 o p53, Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse por tener una ampliación del gen HER2/neu, por sobreexpresar HER2/neu o por tener un nivel bajo, intermedio o alto de expresión de HER2/neu. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse para un marcador seleccionado del grupo que consiste en receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano - 2, Ki-67, CA15-3, CA 27-29 y c-Met. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse como desconocido de ER, rico en ER o pobre en ER. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse como ER-negativo ER-positivo. La tipificación de ER de un cáncer de mama puede realizarse por cualquier método reproductivo. La tipificación de ER de un cáncer de mama puede realizarse como se expone en Onkologie 27: 175-179 (2004). Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse como desconocido de PR, rico en PR o pobre en PR. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse como PR-negativo o PR-positivo. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse como positivo del receptor o negativo del receptor. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede tipificarse como asociado con niveles en sangre elevados de CA 15-3 o CA 27-29, o ambos.

20 Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir un tumor localizado de la mama. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir un tumor de la mama asociado con una biopsia negativa del ganglio linfático centinela (SLN). Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir un tumor de la mama asociado con una biopsia positiva del ganglio linfático centinela (SLN). Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir un tumor de la mama asociado con uno o más ganglios linfáticos axilares positivos, en donde los ganglios linfáticos axilares han sido clasificados mediante un método aplicable. Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir un tumor de la mama que ha sido tipificado por no presentar afectación ganglionar (p. ej., ganglios negativos) por presentar un estado de afectación de los ganglios positivo (p. ej., ganglios positivos). Un cáncer de mama que se ha de tratar puede incluir un tumor de la mama que ha producido metástasis en otras partes del cuerpo. Un cáncer de mama que se ha de tratar se puede clasificar por haber producido metástasis en un lugar seleccionado del grupo que consiste en hueso, pulmón, hígado o cerebro. Un cáncer de mama que se ha de tratar se puede clasificar de acuerdo con una característica seleccionada del grupo que consiste en metastásico, localizado, regional, local-regional, localmente avanzado, distante, multicéntrico, bilateral, ipsilateral, contralateral, recién diagnosticado, recurrente e inoperable.

35 Un compuesto de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de la mama, o para tratar o prevenir cáncer de mama, en un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación con la población en general, o se puede usar para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación con la población en general es un sujeto de sexo femenino con un antecedente familiar o personal de cáncer de mama. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación con la población en general es un sujeto de sexo femenino que tiene una mutación de la línea germinal o espontánea en BRCA1 o BRCA2, o ambos. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación con la población en general es un sujeto de sexo femenino con un antecedente familiar de cáncer de mama y una mutación de la línea germinal o espontánea de BRCA1 o BRCA2, o ambos. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación con la población en general es un sujeto de sexo femenino mayor de 30 años de edad, mayor de 40 años de edad, mayor de 50 años de edad, mayor de 60 años de edad, mayor de 70 años de edad, mayor de 80 años de edad o mayor de 90 años de edad. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación con la población en general es un sujeto con hiperplasia atípica de la mama, carcinoma ductal *in situ* (DCIS), carcinoma intraductal, carcinoma lobular *in situ* (LCIS), neoplasia lobular o tumor o lesión de la mama en estadio 0 (p. ej., carcinoma *in situ* cáncer de mama en estado 0 o grado 0).

50 Un cáncer de mama que se ha de tratar puede clasificarse histológicamente de acuerdo con el sistema de Scarff-Bloom-Richardson, en donde a un tumor de mama se le ha asignado un puntaje de recuento de mitosis de 1, 2 o 3; un puntaje de pleomorfismo nuclear de 1, 2 o 3; un puntaje de formación de túbulos de 1, 2 o 3; y un puntaje de Scarff-Bloom-Richardson total entre 3 y 9. A un cáncer de mama que se ha de tratar se le puede asignar una clasificación del tumor de acuerdo con el Panel de Consenso Internacional sobre el Tratamiento del Cáncer de Mama (International Consensus Panel on the Treatment of Breast Cancer) seleccionado del grupo que consiste en grado 1, grado 1-2, grado 2, grado 2-3 o grado 3.

55 En una realización, se describe en este documento un método para tratar cáncer de mama, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del hidrobromuro del Compuesto.

En otra realización, se describe en este documento un método para tratar el cáncer de mama, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del Polimorfo A.

Un cáncer que se puede tratar puede clasificarse de acuerdo con el sistema de clasificación TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC), en donde al tumor (T) se le ha sido asignado un estadio de TX, T1, T1mic, T1a, T1b, T1c, T2, T3, T4, T4a, T4b, T4c o T4d; y en donde a los ganglios linfáticos regionales (N) se les ha asignado un estadio de NX, N0, N1, N2, N2a, N2b, N3, N3a, N3b o N3c; y en donde a una metástasis distante (M) se le puede asignar un estadio de MX, M0 o M1. Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar de acuerdo con una clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) como de Estadio I, Estadio IIA, Estadio IIB, Estadio IIIA, Estadio IIIB, Estadio IIIC o Estadio IV. A un cáncer que se ha de tratar se le puede asignar un grado de acuerdo con una clasificación del AJCC como Grado GX (p. ej., el grado no puede ser evaluado), Grado 1, Grado 2, Grado 3 o Grado 4. Un cáncer que se ha de tratar puede clasificarse de acuerdo con una clasificación patológica del AJCC (pN) de pNX, pN0, pN0 (I-), pN0 (I+), pN0 (mol-), pN0 (mol+), pN1, pN1(mi), pN1a, pN1b, pN1c, pN2, pN2a, pN2b, pN3, pN3a, pN3b o pN3c.

Un cáncer que se ha de tratar puede incluir un tumor que ha sido determinado menor o igual a aproximadamente 2 centímetros de diámetro. Un cáncer que se ha de tratar puede incluir un tumor que se ha determinado que tiene entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 centímetros de diámetro. Un cáncer que se ha de tratar puede incluir un tumor que se ha determinado que tiene aproximadamente 3 centímetros de diámetro o más. Un cáncer que se ha de tratar puede incluir un tumor que se ha determinado que tiene más de 5 centímetros de diámetro. Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar por aspecto microscópico así como también estar bien diferenciado, moderadamente diferenciado, escasamente diferenciado o indiferenciado. Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar por aspecto microscópico con respecto a recuento de mitosis (p. ej., cantidad de división celular) o pleomorfismo nuclear (p. ej., cambio en las células). Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar por aspecto microscópico como asociado con áreas de necrosis (p. ej., áreas de células muertas o bajo degeneración). Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar por tener cariotipo anormal, tener un número anormal de cromosomas o tener uno o más cromosomas que tienen aspecto anormal. Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar como aneuploide, triploide, tetraploide, o por tener ploidía alterada. Un cáncer que se ha de tratar se puede clasificar por tener translocación cromosómica o una eliminación o duplicación de un cromosoma entero, o una región de eliminación, duplicación o ampliación de una porción de un cromosoma.

Un cáncer que se ha de tratar se puede evaluar por citometría de ADN, citometría de flujo o citometría de imagen. Un cáncer que se ha de tratar puede tipificarse por tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de células en el estadio de síntesis de la división celular (p. ej., en fase S de la división celular). Un cáncer que se ha de tratar puede tipificarse por tener una baja fracción de fase S o una alta fracción de fase S.

Tal como se emplea en esta memoria, una "célula normal" es una célula que no puede clasificarse como parte de un "trastorno proliferativo de las células". Una célula normal carece del crecimiento desregulado o anormal, o ambos, que puede conducir al desarrollo de una condición indeseada o una enfermedad. Preferiblemente, una célula normal posee normalmente mecanismos de control del ciclo celular en funcionamiento.

Tal como se emplea en la presente memoria, "poner en contacto con una célula" se refiere a una condición en la que un compuesto u otra composición de materia está en contacto directo con una célula, o está lo suficientemente cerca como para inducir un efecto biológico deseado en una célula.

Tal como se emplea en la presente memoria, "compuesto candidato" hace referencia a un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también al Polimorfo A) que ha sido o será ensayado en uno o más ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo*, con el fin de determinar si ese compuesto podría producir una respuesta biológica o médica deseada en una célula, tejido, sistema, animal o ser humano que busca un investigador o médico. Un compuesto candidato es un compuesto de la presente invención. La respuesta biológica o médica puede ser el tratamiento del cáncer. La respuesta biológica o médica puede ser el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de las células. La respuesta o el efecto biológico también pueden incluir un cambio en la proliferación o el crecimiento de las células *in vitro* o en un modelo animal, así como también otros cambios biológicos que son observables *in vitro*. Los ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo* pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, ensayos de actividad enzimática, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, ensayos de genes indicadores, ensayos de viabilidad celular *in vitro* y los ensayos que se describen en este documento.

Tal como se emplea en la presente memoria, "monoterapia" hace referencia a la administración de un solo compuesto activo o terapéutico a un sujeto que lo necesita. Preferiblemente, la monoterapia implicará la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo. Por ejemplo, la monoterapia del cáncer con uno de los compuestos de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) a un sujeto que necesita el tratamiento del cáncer. La monoterapia puede contrastarse con terapia de combinación, en donde una combinación de múltiples compuestos activos se administra, preferiblemente con cada componente de la combinación presente en una cantidad terapéuticamente eficaz. En un aspecto, la monoterapia con un compuesto de la presente invención es más eficaz que la terapia de combinación en inducir un efecto biológico deseado.

Tal como se emplea en la presente memoria, "tratar" describe el control y el cuidado de un paciente para los fines de combatir una enfermedad, dolencia o trastorno e incluye la administración de un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) para aliviar los síntomas o

complicaciones de una enfermedad, dolencia o trastorno, o para eliminar la enfermedad, dolencia o trastorno. El término "tratar" también puede incluir el tratamiento de una célula *in vitro* o de un modelo animal.

5 Un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) también se puede utilizar para prevenir una enfermedad, dolencia o trastorno, o se puede usar para identificar candidatos adecuados para dichos propósitos. Tal como se emplea en la presente memoria, "prevenir" describe reducir o eliminar el inicio de los síntomas o complicaciones de la enfermedad, dolencia o trastorno.

10 Tal como se emplea en la presente memoria, se entiende que la expresión "aliviar" describe un proceso mediante el cual se reduce la gravedad de un signo o síntoma de un trastorno. Cabe destacar que un signo o síntoma se puede reducir sin ser eliminado. En una realización preferida, la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención conduce a la eliminación de un signo o síntoma, no obstante, no se requiere la eliminación. Se espera que las dosis eficaces disminuyan la gravedad de un signo o síntoma. Por ejemplo, un signo o síntoma de un trastorno tal como cáncer, que puede ocurrir en múltiples sitios, se reduce si la gravedad del cáncer disminuye dentro de por lo menos uno de múltiples sitios.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "gravedad" describe el potencial del cáncer de transformarse de un estado pre-canceroso o benigno a un estado maligno. Alternativamente o a su vez, la gravedad tiene como fin describir un estadio del cáncer, por ejemplo, de acuerdo con el sistema TNM (aceptado por la Unión Internacional contra el Cáncer (International Union Against Cancer o UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC)) o con otros métodos reconocidos en la técnica. Estadio del cáncer hace referencia al grado o gravedad del cáncer, en función de factores tales como el sitio del tumor primario, el tamaño del tumor, la cantidad de tumores y el compromiso de los ganglios linfáticos (cáncer diseminado hacia los ganglios linfáticos). Alternativamente o a su vez, la gravedad describe el grado del tumor por métodos reconocidos en la técnica (véase, Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute), www.cancer.gov). El grado del tumor es un sistema utilizado para clasificar células cancerosas en términos de qué tan anormales lucen bajo un microscopio y qué tan rápido es propenso a crecer y diseminarse el tumor. Se tienen en cuenta muchos factores a la hora de determinar el grado del tumor, incluidos la estructura y el patrón de crecimiento de las células. Los factores específicos utilizados para determinar el grado del tumor varían con cada tipo de cáncer. La gravedad también describe un grado histológico, también denominado diferenciación, que hace referencia a cuánto se asemejan las células tumorales a las células normales del mismo tipo de tejido (véase, National Cancer Institute, www.cancer.gov). Asimismo, la gravedad describe un grado nuclear, que se refiere al tamaño y la forma del núcleo en las células tumorales y al porcentaje de células tumorales que se están dividiendo (véase, National Cancer Institute, www.cancer.gov).

25 En otro aspecto de la invención, la gravedad describe el grado hasta el cual un tumor ha segregado factores de crecimiento, degradado la matriz extracelular, se ha vascularizado, perdido la adhesión a tejidos yuxtapuestos o ha formado metástasis. A su vez, la gravedad describe el número de sitios en los cuales el tumor ha formado metástasis. Finalmente, la gravedad incluye la dificultad de tratar tumores de distintos tipos y sitios. Por ejemplo, los tumores inoperables, aquellos tipos de cáncer que tienen mayor acceso a múltiples sistemas corporales (tumores hematológicos e inmunológicos), y aquellos que son los más resistentes a los tratamientos tradicionales se consideran los más graves. En estas situaciones, prolongar la esperanza de vida del sujeto y/o reducir el dolor, disminuir la proporción de células cancerosas o restringir las células a un sistema, y mejorar el estadio del cáncer/grado del tumor/grado histológico/grado nuclear se consideran aliviar un signo o síntoma del cáncer.

40 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "síntoma" se define como una indicación de enfermedad, dolencia, lesión o algo que no está bien en el cuerpo. El individuo que experimenta los síntomas, los siente o nota, pero pueden no ser fácilmente notorios para otras personas. Las otras personas se definen como no profesionales sanitarios.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "signo" también se define como una indicación de que algo no está bien en el cuerpo. Pero los signos se definen como cosas que pueden ser observadas por un médico, enfermero u otro profesional sanitario.

50 El cáncer es un grupo de enfermedades que pueden causar prácticamente cualquier signo o síntoma. Los signos y síntomas dependerán de dónde esté localizado el cáncer, el tamaño del cáncer y cuánto afecta a los órganos o estructuras adyacentes. Si un cáncer se propaga (forma metástasis), entonces los síntomas pueden aparecer en diferentes partes del cuerpo.

A medida que el cáncer se desarrolla, comienza a presionar los órganos, vasos sanguíneos y nervios adyacentes. Esta presión crea algunos de los signos y síntomas del cáncer. Si el cáncer está en una zona crítica, como ciertas partes del cerebro, incluso el tumor más pequeño puede causar síntomas tempranos.

55 Pero algunas veces el cáncer comienza en lugares en los que no causa ningún síntoma, hasta que ha crecido demasiado. El cáncer de páncreas, por ejemplo, por lo general no crece tanto como para sentirse fuera del cuerpo. Algunos cánceres de páncreas no causan síntomas hasta que comienzan a crecer alrededor de los nervios circundantes (esto provoca lumbalgia). Otros crecen alrededor del conducto colédoco, lo cual bloquea el flujo de bilis

y provoca un color amarillo en la piel conocido como ictericia. Para el momento en que un cáncer de páncreas causa estos signos o síntomas, por lo general ha alcanzado un estadio avanzado.

5 Un cáncer puede también causar síntomas tales como fiebre, fatiga o pérdida de peso. Esto puede deberse a que las células de cáncer consumen parte del suministro de energía del cuerpo o liberan sustancias que cambian el metabolismo corporal. O el cáncer puede causar que el sistema inmunológico reaccione en formas que producen estos síntomas.

10 En ocasiones, las células de cáncer liberan sustancias en el torrente circulatorio que causan síntomas que por lo general no se cree que provoquen cáncer. Por ejemplo, algunos tipos de cáncer del páncreas pueden liberar sustancias que provocan el desarrollo de coágulos de sangre en las venas de las piernas. Algunos tipos de cáncer de pulmón producen sustancias de tipo hormonas que afectan los niveles de calcio en la sangre, afectan a los nervios y músculos, y causan debilidad y mareos

15 El cáncer presenta varios signos o síntomas generales que ocurren cuando están presentes una variedad de subtipos de células cancerosas. La mayoría de las personas con cáncer adelgazan en alguno momento con su enfermedad. Un adelgazamiento inexplicable (no intencional) de 10 libras o más puede ser el primer signo de cáncer, particularmente de algún tipo de cáncer del páncreas, el estómago el esófago o el pulmón.

La fiebre es muy común con el cáncer, pero se observa con mayor frecuencia en la enfermedad avanzada. Prácticamente todos los pacientes con cáncer suelen tener fiebre en algún momento, especialmente si el cáncer o su tratamiento afecta al sistema inmunológico y hace que al organismo le resulte difícil combatir las infecciones. Con menos frecuencia, la fiebre puede ser un signo temprano de cáncer, tal como con leucemia o linfoma.

20 La fatiga puede ser un síntoma importante a medida que el cáncer avanza. Aunque puede ocurrir tempranamente en tipos de cáncer tales como la leucemia, o si el cáncer está causando una pérdida de sangre continua, como en algunos tipos de cáncer de colon o estómago.

El dolor puede ser un síntoma temprano con algunos tipos de cáncer tales como el cáncer de hueso o el cáncer de testículo. Pero a menudo el dolor es un síntoma de la enfermedad avanzada.

25 Junto con los tipos de cáncer de piel (véase la sección siguiente), algunos tipos de cáncer internos pueden provocar signos en la piel que pueden ser visibles. Estos cambios incluyen un aspecto más oscuro de la piel (hiperpigmentación), piel amarilla (ictericia) o roja (eritema); comezón o crecimiento excesivo del cabello.

30 Alternativamente o a su vez, los subtipos de cáncer presentan signos o síntomas específicos. Cambios en los hábitos intestinales o en el funcionamiento de la vejiga podrían indicar cáncer. La constipación o la diarrea a largo plazo, o un cambio en el tamaño de las heces, pueden ser signos de cáncer de colon. El dolor con la orina, sangre en la orina o un cambio en el funcionamiento de la vejiga (tal como orina más o menos frecuente) podrían asociarse con cáncer de vejiga o de próstata.

35 Los cambios en el estado de la piel o la aparición de una nueva afección en la piel podrían indicar cáncer. El cáncer de piel puede sangrar y lucir como llagas que no cicatrizan. Una llaga a largo plazo en la boca podría ser un cáncer oral, especialmente en pacientes que fuman, mastican tabaco o beben alcohol con frecuencia. Las llagas en el pene o la vagina puede ser o bien signos de infección o de un cáncer incipiente.

40 La hemorragia o secreción inusual podría indicar cáncer. La hemorragia inusual podría suceder en cáncer incipiente o avanzado. La sangre en el esputo (flema) podría ser un signo de cáncer de pulmón. La sangre en las heces (o heces oscuras o negras) podría ser un signo de cáncer de colon o rectal. El cáncer del cuello uterino o del endometrio (revestimiento del útero) puede causar hemorragia vaginal. La sangre en la orina puede ser un signo de cáncer de vejiga o riñón. Una secreción sanguinolenta del pezón puede ser un signo de cáncer de mama.

45 Un engrosamiento o bulto en la mama o en otras partes del cuerpo podría indicar la presencia de un cáncer. Muchos tipos de cáncer pueden sentirse a través de la piel, principalmente en la mama, el testículo, los ganglios linfáticos y los tejidos blandos del cuerpo. Un bulto o engrosamiento puede ser un signo incipiente o tardío de cáncer. Cualquier bulto o engrosamiento podría ser indicativo de cáncer, especialmente si la formación es nueva o ha aumentado de tamaño.

La indigestión o la dificultad para deglutir podría indicar cáncer. Si bien estos síntomas comúnmente tienen otras causas, la indigestión o los problemas para deglutir pueden ser un signo de cáncer del esófago, el estómago o la faringe (garganta).

50 Cambios recientes en una verruga o lunar podrían ser indicativos de cáncer. Cualquier verruga, lunar o peca que cambia de color, tamaño o forma, o que pierde sus bordes definidos, indica el desarrollo potencial de cáncer. Por ejemplo, la lesión de la piel puede ser un melanoma.

Una tos o disfonía persistente podría ser indicativa de cáncer. Una tos que no desaparece puede ser un signo de cáncer de pulmón. La disfonía puede ser un signo de cáncer de la laringe o la tiroides.

Si bien los signos y síntomas enumerados anteriormente son los más frecuentemente observados con el cáncer, hay muchos otros menos comunes que no se mencionan aquí. No obstante, todos los signos y síntomas de cáncer reconocidos en la técnica se contemplan y abarcan la presente invención.

5 El tratamiento del cáncer puede resultar en una reducción del tamaño de un tumor. Una reducción del tamaño de un tumor puede también denominarse "regresión del tumor". Preferiblemente, después del tratamiento, el tamaño del tumor se reduce en 5% o más en relación con su tamaño anterior al tratamiento; más preferiblemente, el tamaño del tumor se reduce en 10% o más; más preferiblemente, se reduce en 20% o más; más preferiblemente, se reduce en 30% o más; más preferiblemente se reduce en 40% o más; incluso más preferiblemente, se reduce en 50% o más; y lo más preferiblemente, se reduce en más de 75% o más. El tamaño de un tumor se puede medir con cualquier método de medición reproducible. El tamaño de un tumor se puede medir como un diámetro del tumor.

10 Tratar el cáncer puede resultar en una reducción del volumen del tumor. Preferiblemente, después del tratamiento, el volumen del tumor se reduce en 5% o más en relación con su tamaño antes del tratamiento; más preferiblemente, el volumen del tumor se reduce en 10% o más; más preferiblemente, se reduce en 20% o más; más preferiblemente, se reduce en 30% o más; más preferiblemente, se reduce en 40% o más; incluso más preferiblemente, se reduce en 50% o más; y lo más preferiblemente, se reduce en más de 75% o más. El volumen del tumor se puede medir con cualquier método de medición reproducible.

15 El tratamiento del cáncer resulta en una reducción del número de tumores. Preferiblemente, después del tratamiento, el número de tumores se reduce en 5% o más en relación con el número antes del tratamiento; más preferiblemente, el número del tumor se reduce en 10% o más; más preferiblemente, se reduce en 20% o más; más preferiblemente, se reduce en 30% o más; más preferiblemente, se reduce en 40% o más; incluso más preferiblemente, se reduce en 50% o más; y lo más preferiblemente, se reduce en más de 75%. El número de tumores se puede medir mediante cualquier método reproducible de medición. El número de tumores se puede medir contando los tumores visibles a simple vista o en una ampliación especificada. Preferiblemente, la ampliación especificada es 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o 50x.

20 El tratamiento del cáncer puede resultar en una reducción del número de lesiones metastásicas en otros tejidos u órganos distantes del sitio del tumor primario. Preferiblemente, después del tratamiento, el número de lesiones metastásicas se reduce en 5% o más en relación con el número antes del tratamiento; más preferiblemente, el número de lesiones metastásicas se reduce en 10% o más; más preferiblemente, se reduce en 20% o más; más preferiblemente, se reduce en 30% o más; más preferiblemente, se reduce en 40% o más; incluso más preferiblemente, se reduce en 50% o más; y lo más preferiblemente, se reduce en más de 75%. El número de lesiones metastásicas se puede medir por cualquier método de medición reproducible. El número de lesiones metastásicas se puede medir contando las lesiones metastásicas visibles a simple vista o en una ampliación especificada. Preferiblemente, la ampliación especificada es 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o 50x.

25 El tratamiento del cáncer puede resultar en un incremento del tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe vehículo solo. Preferiblemente, el tiempo de supervivencia promedio aumenta por más de 30 días; más preferiblemente, por más de 60 días; más preferiblemente, por más de 90 días; y lo más preferiblemente, por más de 120 días. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir por cualquier método reproducible. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la longitud promedio de supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población puede medirse también, por ejemplo, calculando para una población la longitud promedio de supervivencia después de completar una primera tanda de tratamiento con un compuesto activo.

30 El tratamiento del cáncer puede resultar en un incremento del tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados, en comparación con una población de sujetos no tratados. Preferiblemente, el tiempo de supervivencia promedio aumenta por más de 30 días; más preferiblemente, por más de 60 días; más preferiblemente, por más de 90 días; y lo más preferiblemente, por más de 120 días. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir por cualquier método reproducible. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la longitud promedio de supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la longitud promedio de supervivencia después de completar una primera tanda de tratamiento con un compuesto activo.

35 El tratamiento del cáncer puede resultar en un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados, en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto de la presente invención. Preferiblemente, el tiempo de supervivencia promedio aumenta por más de 30 días; más preferiblemente, por más de 60 días; más preferiblemente, por más de 90 días; y lo más preferiblemente, por más de 120 días. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir por cualquier medio reproducible. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la longitud promedio de supervivencia después del inicio del

tratamiento con un compuesto activo. Un incremento en el tiempo de supervivencia promedio de una población puede también medirse, por ejemplo, calculando para una población la longitud promedio de supervivencia después de completar una primera tanda de tratamiento con un compuesto activo.

5 El tratamiento del cáncer puede resultar en una reducción del índice de mortalidad de una población de sujetos tratados, en comparación con una población de sujetos que reciben vehículo solo. El tratamiento del cáncer puede resultar en una reducción del índice de mortalidad de una población de sujetos tratados, en comparación con una población de sujetos no tratados. El tratamiento del cáncer puede resultar en una reducción del índice de mortalidad de una población de sujetos tratados, en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto de la presente invención. Preferiblemente, el índice de mortalidad se reduce por más de 2%; más preferiblemente, por más de 5%; más preferiblemente, por más de 10%; y lo más preferiblemente, por más de 25%. Una reducción en el índice de mortalidad de una población de sujetos tratados se puede medir con cualquier método reproducible. Una reducción en el índice de mortalidad de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número promedio de muertes relacionadas con la enfermedad por unidad de tiempo después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Una reducción en el índice de mortalidad de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número promedio de muertes relacionadas con la enfermedad por unidad de tiempo después del inicio de una primera tanda de tratamiento con un compuesto activo.

20 El tratamiento del cáncer puede resultar en una reducción del índice de crecimiento del tumor. Preferiblemente, después del tratamiento, el índice de crecimiento del tumor se reduce en por lo menos 5% en relación con el número anterior al tratamiento; más preferiblemente, el índice de crecimiento del tumor se reduce en por lo menos 10%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 20%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 30%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 40%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 50%; incluso más preferiblemente, se reduce en por lo menos 50%; y lo más preferiblemente, se reduce en por lo menos 75%. El índice de crecimiento del tumor se puede medir por cualquier método de medición reproducible. El índice de crecimiento del tumor se puede medir de acuerdo con un cambio en el diámetro del tumor por unidad de tiempo.

30 El tratamiento del cáncer puede resultar en un recrecimiento del tumor. Preferiblemente, después del tratamiento, el recrecimiento del tumor es inferior a 5%; más preferiblemente, el recrecimiento del tumor es inferior a 10%; más preferiblemente, inferior a 20%; más preferiblemente, inferior a 30%; más preferiblemente, inferior a 40%; más preferiblemente, inferior a 50%; incluso más preferiblemente, inferior a 50%; y lo más preferiblemente, inferior a 75%. El recrecimiento del tumor se puede medir por cualquier método de medición reproducible. El recrecimiento del tumor se mide, por ejemplo, midiendo un incremento en el diámetro de un tumor después de una reducción previa del tumor que siguió al tratamiento. Una reducción en el recrecimiento del tumor se indica por la imposibilidad de los tumores de reaparecer después de que cesa el tratamiento.

35 Tratar o prevenir un trastorno proliferativo de las células puede resultar en una reducción del índice de proliferación celular. Preferiblemente, después del tratamiento, el índice de proliferación celular se reduce por al menos 5%; más preferiblemente, por al menos 10%; más preferiblemente, por al menos 20%; más preferiblemente, por al menos 30%; más preferiblemente, por al menos 40%; más preferiblemente, por al menos 50%; incluso más preferiblemente, por al menos 50%; y lo más preferiblemente, por al menos 75%. El índice de proliferación celular se puede medir con cualquier método de medición reproducible. El índice de proliferación celular se mide, por ejemplo, midiendo el número de células en proceso de división en una muestra de tejido por unidad de tiempo.

45 El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de las células puede resultar en una reducción en la proporción de células proliferativas. Preferiblemente, después del tratamiento, la proporción de células que proliferan se reduce en por lo menos 5%; más preferiblemente, en por lo menos 10%; más preferiblemente, en por lo menos 20%; más preferiblemente, en por lo menos 30%; más preferiblemente, en por lo menos 40%; más preferiblemente, en por lo menos 50%; incluso más preferiblemente, en por lo menos 50%; y lo más preferiblemente, en por lo menos 75%. La proporción de células que proliferan se puede medir con cualquier método de medición reproducible. Preferiblemente, la proporción de células que proliferan se mide, por ejemplo, cuantificando el número de células en proceso de división en relación con el número de células que no están en proceso de división en una muestra de tejido. La proporción de células que proliferan puede ser equivalente al índice mitótico.

50 El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de las células puede resultar en una reducción del tamaño de un área o zona de proliferación celular. Preferiblemente, después del tratamiento, el tamaño de un área o zona de proliferación celular se reduce en por lo menos 5% en relación con su tamaño antes del tratamiento; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 10%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 20%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 30%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 40%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 50%; incluso más preferiblemente, se reduce en por lo menos 50%; y lo más preferiblemente, se reduce en por lo menos 75%. El tamaño de un área o zona de proliferación celular se puede medir por cualquier medio de medición reproducible. El tamaño de un área o zona de proliferación celular se puede medir como un diámetro o ancho de un área o zona de proliferación celular.

60 El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo de las células puede resultar en una reducción del número o la proporción de células que tienen aspecto o morfología anormal. Preferiblemente, después del tratamiento, el

número de células que tienen una morfología anormal se reduce en por lo menos 5% en relación con su tamaño antes del tratamiento; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 10%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 20%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 30%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 40%; más preferiblemente, se reduce en por lo menos 50%; incluso más preferiblemente, se reduce en por lo menos 50%; y lo más preferiblemente, se reduce en por lo menos 75%. Un aspecto o morfología celular anormal se puede medir con cualquier método de medición reproducible. Una morfología anormal se puede medir por microscopia, p. ej., usando un microscopio para cultivo celular invertido. Una morfología celular anormal puede adoptar la forma de pleomorfismo nuclear.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "selectivamente" significa que tiende a ocurrir en una frecuencia mayor en una población que en otra. Las poblaciones comparadas pueden ser poblaciones celulares. Preferiblemente, un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) actúa selectivamente en una célula cancerosa o pre-cancerosa pero no en una célula normal. Preferiblemente, un compuesto de la presente invención actúa selectivamente para modular una diana molecular (p. ej., una proteína diana metiltransferasa) pero no modula significativamente otra diana molecular (p. ej., una proteína no diana metiltransferasa). La invención también da a conocer un método para inhibir selectivamente la actividad de una enzima, tal como una proteína metiltransferasa. Preferiblemente, un evento ocurre selectivamente en la población A en relación con la población B, si ocurre más de dos veces más a menudo en la población A en comparación con la población B. Un evento ocurre selectivamente si ocurre más de cinco veces más a menudo en la población A. Un evento ocurre selectivamente si ocurre más de diez veces más a menudo en la población A; más preferiblemente, más de cincuenta veces; incluso más preferiblemente, más de 100 veces; y lo más preferiblemente más de 1000 veces más a menudo en la población A en comparación con la población B. Por ejemplo, se diría que la muerte celular ocurre selectivamente en células cancerosas si ocurrió más de dos veces más a menudo en células cancerosas que en células normales.

Un compuesto de la presente invención puede modular la actividad de una diana molecular (p. ej., una proteína diana metiltransferasa). Modulación se refiere a estimular o inhibir una actividad de una diana molecular. Preferiblemente, un compuesto de la presente invención modula la actividad de una diana molecular si estimula o inhibe la actividad de la diana molecular en por lo menos 2 veces en relación con la actividad de la diana molecular bajo las mismas condiciones pero carente solamente de la presencia de dicho compuesto. Más preferiblemente, un compuesto de la presente invención modula la actividad de una diana molecular si estimula o inhibe la actividad de la diana molecular en por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces en relación con la actividad de la diana molecular bajo las mismas condiciones pero carente solamente de la presencia de dicho compuesto. La actividad de una diana molecular se puede medir por cualquier método reproducible. La actividad de una diana molecular se puede medir *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la actividad de una diana molecular se puede medir *in vitro* con un ensayo de actividad enzimática o ensayo de unión de ADN, o la actividad de una diana molecular se puede medir *in vivo* ensayando la expresión de un gen indicador.

Un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) no modula de manera significativa la actividad de una diana molecular si la adición del compuesto no estimula ni inhibe la actividad de la diana molecular en más de 10% en relación a la actividad de la diana molecular bajo las mismas condiciones pero carente de solamente de la presencia de dicho compuesto.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "selectiva de isoenzima" significa una inhibición o estimulación preferencial de una primera isoforma de una enzima en comparación con una segunda isoforma de una enzima (p. ej., la inhibición o estimulación preferencial de una isoenzima de proteína metiltransferasa alfa en comparación con una isoenzima de proteína metiltransferasa beta). Preferiblemente, un compuesto de la presente invención demuestra un mínimo de diferencial de cuatro veces, preferiblemente un diferencial de diez veces, más preferiblemente un diferencial de cincuenta veces, en la dosis requerida para lograr un efecto biológico. Preferiblemente, un compuesto de la presente invención demuestra este diferencial en todo el intervalo de inhibición, y el diferencial se ejemplifica en la CI_{50} , es decir, una inhibición del 50%, para una diana molecular de interés.

La administración de un compuesto de la presente invención a una célula o a un sujeto que la necesita puede producir la modulación (es decir, la estimulación o inhibición) de una actividad de una proteína metiltransferasa de interés.

El tratamiento del cáncer o de un trastorno proliferativo de las células puede resultar en la muerte celular, y preferiblemente, la muerte celular resulta en una disminución de por lo menos 10% en el número de células de una población. Más preferiblemente, la muerte celular significa una reducción de por lo menos 20%; más preferiblemente, una reducción de por lo menos 30%; más preferiblemente, una reducción de por lo menos 40%; más preferiblemente, una reducción de por lo menos 50%; lo más preferiblemente, una reducción de por lo menos 75%. El número de células en una población se puede medir por cualquier método reproducible. Un número de células de una población se puede medir por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), microscopia de inmunofluorescencia y microscopia de luz. Los métodos para medir la muerte celular se exponen en Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5): 2674-8, 2003- En un aspecto, la muerte celular ocurre por apoptosis.

Preferiblemente, una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención no es significativamente citotóxica para las células normales. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto no es significativamente citotóxica para las células normales si la administración del compuesto en una cantidad terapéuticamente eficaz no induce la muerte celular en más de 10% de las células normales. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto no afecta significativamente la viabilidad de las células normales si la administración del compuesto en una cantidad terapéuticamente eficaz no induce la muerte celular en más de 10% de las células normales. En un aspecto, la muerte celular ocurre por apoptosis.

Poner en contacto una célula con un compuesto de la presente invención puede inducir o activar la muerte celular selectivamente en células cancerosas. Administrar a un sujeto que necesita un compuesto de la presente invención puede inducir o activar la muerte celular selectivamente en células de cáncer. Poner en contacto una célula con un compuesto de la presente invención puede inducir la muerte celular selectivamente en una o más células afectadas por un trastorno proliferativo de las células. Preferiblemente, la administración a un sujeto que necesita un compuesto de la presente invención induce la muerte celular selectivamente en una o más células afectadas por un trastorno proliferativo de las células.

La presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir cáncer (p. ej., cuyo curso puede estar influenciado por la modulación de metilación de proteína mediada por EZH2) administrando un compuesto de la presente invención (es decir, el hidrobromuro del Compuesto I, así como también el Polimorfo A) a un sujeto que lo necesita, en donde la administración del compuesto de la presente invención resulta en uno o más de los siguientes: prevención de proliferación de células cancerosas por acumulación de células en una o más fases del ciclo celular (p. ej., G1, G1/S, G2/M), o inducción de senescencia celular, o promoción de diferenciación de células tumorales; promoción de muerte celular en células cancerosas mediante citotoxicidad, necrosis o apoptosis, sin una cantidad significativa de muerte celular en células normales, actividad antitumoral en animales con un índice terapéutico de por lo menos 2. Tal como se emplea en la presente memoria, "índice terapéutico" es la dosis máxima tolerada dividida por la dosis eficaz. La presente invención también se refiere a un método utilizado para identificar candidatos adecuados para tratar o prevenir el cáncer.

El experto en la materia puede consultar los textos para descripción detallada de las técnicas conocidas analizadas en este documento o técnicas equivalentes. Estos textos incluyen Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª edición), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2000); Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna et al., *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975), Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18ª (1990). Desde ya, también se pueden consultar estos textos para la preparación o el uso de un aspecto de la invención.

Ejemplos

35 Materiales y métodos

Difracción de rayos X por polvo

La PXRD para todas las muestras se tomó en un dispositivo Rigaku MultiFlex (Diana: Cu; voltaje del tubo: 40 kV; corriente del tubo: 30 mA).

Calorimetría de barrido diferencial

40 La DSC para todas las muestras se tomó en un dispositivo Mettler-Toledo DSC 1/700 (Condiciones de ejecución: temperatura inicial 35°C, temp final 325°C, velocidad de calentamiento 30°C/min).

Cristalografía de rayos X

Se montó un cristal de placa incolora de 0,28 x 0,22 x 0,06 mm en un lazo de nylon usando una muy pequeña cantidad de aceite Paratone. Los datos se recogieron usando un difractómetro Bruker basado en CCD (dispositivo acoplado a carga) equipado con un aparato de baja temperatura Oxford Cryostream que operaba a 173 K. Los datos se midieron usando barridos omega y phi de 0,5° por marco durante 45 s. El número total de imágenes se basó en los resultados del programa COSMO en donde se esperaba que la redundancia fuese 4,0 y la totalidad hasta 100% de 0,83 Å. Los parámetros celulares se recuperaron usando el software APEX II y se redefinieron usando SAINT en todas las reflexiones observadas. La reducción de los datos se efectuó usando el software SAINT que corrige Lp. Se aplicaron correcciones de graduación y absorción usando la técnica de multibarrido SADABS, provista por George Sheldrick. Las estructuras se resuelven por el método directo, utilizando el programa SHELXS-97 y se refinan por el método de mínimos cuadráticos en F², SHELXL- 97, que se incorporan en SHELXTL-PC V 6,10.

55 La estructura que se muestra en la Figura 11 se resolvió en el grupo espacial P2₁/c (# 14). Todos los átomos no de hidrógeno se redefinen de manera anisotrópica. Los hidrógenos se calcularon por métodos geométricos y se refinaron como un modelo *riding*. El cristal utilizado para el estudio de difracción no demostró descomposición durante la recopilación de los datos. Todos los dibujos se realizan a 50% elipsoides.

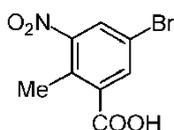
Sorción dinámica de vapor

La DVS se midió en un sistema VTI Modelo SGA-100. Método de medición: la humedad relativa (HR) se cambió en un modo controlado, en etapas de 5%, de 5,0% a 95,0% luego nuevamente a 5,0% usando el sistema de sorción gravimétrica de vapor, y se midió el porcentaje de cambio en peso (% en peso) de la muestra en cada etapa.

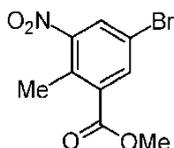
5 HPLC

La HPLC se efectuó en una bomba cuaternaria de HPLC Agilent 1200, mezclando a baja presión con un desgasificador en línea. Condiciones del método analítico: 8 μ l muestra (20 mg de ER-581982-06 diluidos con 50 ml de metanol para proporcionar aproximadamente 0,4 mg/ml de disolución) se inyectaron en un aparato Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m). Condiciones de cromatografía: fase móvil A, agua con formiato de amonio 5mM; fase móvil B, formiato de amonio 5 mM en 50/45/5 acetonitrilo/metanol/agua; caudal, 1,5 ml/min.; gradiente: isocrático a 10% B de 0 a 3 min; incremento lineal hasta 70% B de 3 a 7 min; isocrático a 70% B de 7 a 12 min; incremento lineal hasta 100% B de 12 a 15 min isocrático a 100% B de 15 a 20 min; temperatura de la columna, 35 °C; detección, UV 230 nm. Tiempo de retención aproximado del Compuesto I = 10,7 min.

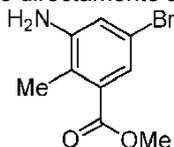
Síntesis del Polimorfo A



15 Ácido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico Una disolución agitada de ácido 2-metil-3-nitrobenzoico (100 g, 552 mmol) en H₂SO₄ conc. (400 ml), 1,3-dibromo-5,5-dimetil-2,4-imidazolidinadiona (88 g, 308 mmol) se añadió en porciones a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó luego a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se vertió en agua enfriada con hielo, el sólido precipitado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para proporcionar el compuesto deseado en la forma de un sólido (140 g, 98%). El compuesto aislado se transfirió directamente a la etapa siguiente. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8,31 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 2,43 (s, 3H).

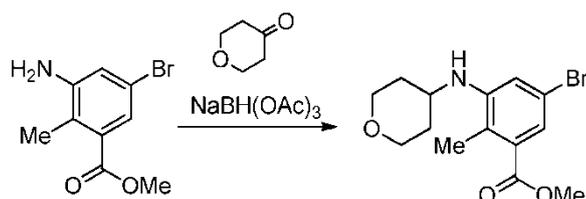


25 5-Bromo-2-metil-3-nitrobenzoato de metilo A una disolución agitada de ácido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico (285 g, 1105 mmol) en DMF (2,8 l) a temperatura ambiente se le añadió carbonato de sodio (468 g, 4415 mmol) seguido de la adición de yoduro de metilo (626,6 g, 4415 mmol). La mezcla de reacción resultante se calentó a 60 °C durante 8 h. Después de completar (monitoreo por TLC), la mezcla de reacción se filtró (para eliminar el carbonato de sodio) y se lavó con acetato de etilo (1 l X 3). El filtrado combinado se lavó con agua (3 l X 5) y la fase acuosa se retroextrajo con acetato de etilo (1 l X 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido (290g, 97% de rendimiento). El compuesto aislado se transfirió directamente a la etapa siguiente. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,17



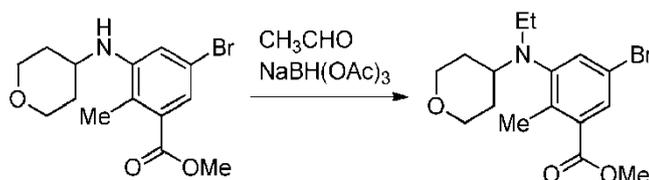
(s, 1H), 7,91 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 2,59 (s, 3H).

35 3-Amino-5-bromo-2-metilbenzoato de metilo (1) A una disolución agitada de 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato de metilo (290 g, 1058 mmol) en etanol (1,5 l) se le añadió cloruro de amonio acuoso (283 g, 5290 mmol disuelto en 1,5 l agua). La mezcla resultante se agitó a 80°C, tras lo cual se añadió hierro en polvo (472 g, 8451 mmol) en porciones. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante 12 h. Tras completar según lo determinado por TLC, la mezcla de reacción se filtró en caliente sobre celite® y el lecho de celite se lavó con metanol (5 l) seguido de lavado con MeOH al 30% en DCM (5 l). El filtrado combinado se concentró al vacío, el residuo obtenido se diluyó con disolución acuosa de bicarbonato sódico (2 l) y se extrajo con acetato de etilo (5 l X 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto del título en forma de un sólido (220 g, 85%). El compuesto se transfirió directamente a la etapa siguiente. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,37 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,80 (bs, 2H), 2,31 (s, 3H).

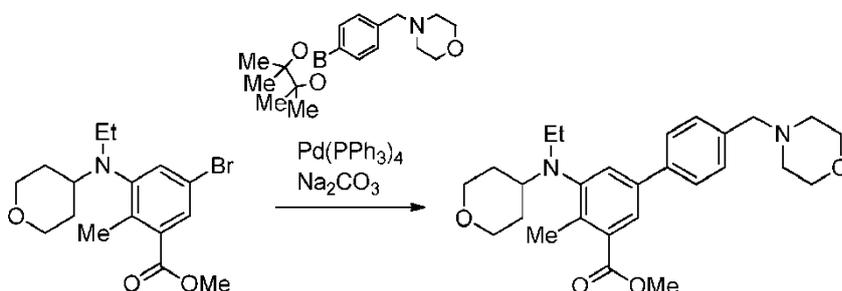


5-Bromo-2-metil-3-((tetrahydro-2H-piran-4-il) amino) benzoato de metilo (2) Se cargó un reactor con 3-amino-5-bromo-2-metilbenzoato de metilo (455,8 g, 1,87 mol), 1,2-Dicloroetano (4,56 l) y ácido acético (535 ml, 9,34 mol). A la mezcla se le añadieron dihidro-2H-piran-4(3H)-ona (280 g, 2,80 mol) y triacetoxiborohidruro de sodio (594 g, 2,80 mol) manteniendo la temperatura interna debajo de 40 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2,5 h y luego la reacción se inactivó con una disolución de hidróxido sódico (448 g, 11,20 mol) en agua (5,61 l). Después de agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente, la capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3,65 l). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (1,5 l) y se concentraron al vacío.

El residuo se trató con acetato de etilo (1,8 l) y se calentó a 65-70 °C. La mezcla se agitó a 65-70 °C durante 15 minutos para dar una disolución clara y luego se trató con n-heptano (7,3 l) manteniendo la temperatura entre 60-70 °C. Una vez que se había añadido el heptano por completo a la disolución, la mezcla se mantuvo a 65-70 °C por 15 minutos y luego se dejó enfriar hasta 18-22 °C durante 3 h. La suspensión resultante se agitó a 18-22 °C durante 4 h, se enfrió hasta 0-5 °C durante 1 h y se mantuvo a 0-5 °C durante 2 h. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con n-heptano (1,4 l) y se secó al vacío para dar el compuesto del título (540 g, 88%). El patrón de XRPD de este compuesto se muestra en la Figura 17.

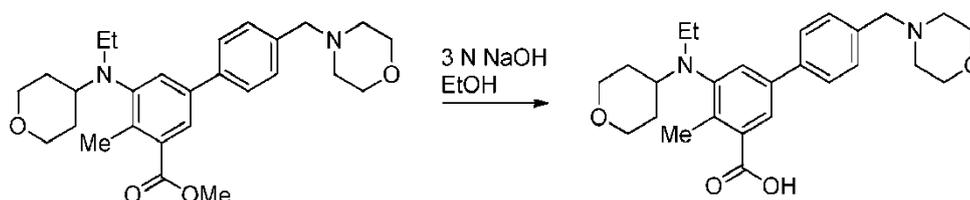


5-Bromo-3-(etil (tetrahydro-2H-piran-4-il) amino)-2-metilbenzoato de metilo (3) A una disolución agitada de 5-bromo-2-metil-3-((tetrahydro-2H-piran-4-il) amino) benzoato de metilo (14 g, 42,7 mmol) en dicloroetano (150 ml) se le añadieron acetaldehído (3,75 g, 85,2 mmol) y ácido acético (15,3 g, 256 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (27 g, 128 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras completar la reacción según lo determinado por TLC, se añadió disolución acuosa de bicarbonato sódico a la mezcla de reacción hasta obtener un pH 7-8, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice de malla 100-200) eluyendo con acetato de etilo: hexano para dar el compuesto deseado en forma de un líquido viscoso (14 g, 93%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7,62 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 3,80 (bs, 5H), 3,31 (t, 2H), 2,97-3,05 (m, 2H), 2,87-2,96 (m, 1H), 2,38 (s, 3H), 1,52-1,61 (m, 2H), 1,37-1,50 (m, 2H), 0,87 (t, 3H, J=6,8 Hz).



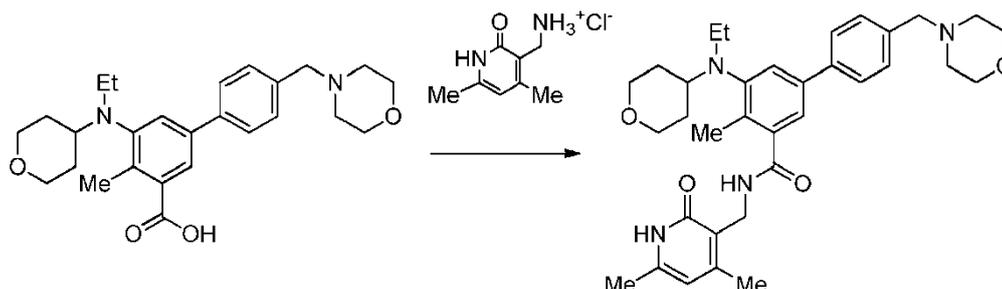
5-(Etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de metilo (4): Una mezcla de 5-bromo-3-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-2-metilbenzoato de metilo (580 g, 1,63 mol), 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzil)morfolina (592 g, 1,95 mol), 1,4-dioxano (3,86 l), carbonato sódico (618 g, 5,83 mol) y agua (771 ml) se desgasificó burbujeando nitrógeno por la mezcla a 20 °C durante 20 minutos y se trató con tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (14,11 g, 12,21 mmol). La mezcla resultante se desgasó durante otros 20 minutos y luego se calentó hasta 87-89 °C por 17 h. Después de enfriar hasta 20 °C, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (5,80 l) y una disolución de ácido (R)-2-Amino-3-mercaptopropiónico (232 g) en agua (2,320 l). Después de agitar durante 1 h a 20 °C, la capa orgánica se separó y se lavó con una disolución de ácido (R)-2-Amino-3-mercaptopropiónico (232 g) en agua (2,320 l). Las capas acuosas se combinaron y extrajeron con acetato de etilo (5,80 l). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con una disolución de hidróxido sódico (93 g) en agua (2,32

l) y se concentraron al vacío a 35 °C para dar el compuesto del título en forma de un aceite anaranjado (1,21 kg, 164% de rendimiento).



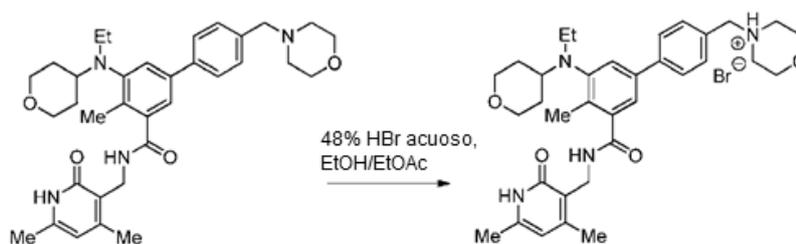
5 Ácido 5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico (5): 5-(Etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de metilo (69,0 g, 152,5 mmol) (basado en el rendimiento teórico de la etapa previa) se suspendió en etanol (380 ml) y se trató con una disolución de hidróxido sódico (24,84 g, 621,0 mmol) en agua (207 ml). La mezcla se agitó a 40 °C durante 18 h. Después de enfriar hasta 0-5 °C, la mezcla se neutralizó hasta pH 6,5 con ácido clorhídrico 1 N (580 ml) manteniendo la temperatura debajo de 25 °C. Luego la mezcla se extrajo dos veces con una mezcla de diclorometano (690 ml) y metanol (69,0 ml). Las capas orgánicas se combinaron y concentraron al vacío para dar un producto bruto en la forma de un sólido amarillo (127 g).

15 El producto bruto se disolvió en 2-metiltetrahidrofurano (656 ml) a 70 °C y luego se trató con IPA (828 ml). La mezcla se dejó enfriar hasta ta durante 3-4 h y luego se agitó durante la noche a ta. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con IPA (207 ml) y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (53,54 g, 80%). El patrón de XRPD de este compuesto se muestra en la Figura 9.



20 N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida (Compuesto I): Una mezcla de ácido 5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico (540 g, 1,23 mol) e hidrocloreto de 3-(aminometil)-4,6-dimetil-dihidropiridin-2(1H)-ona (279 g, 1,48 mol) se suspendió en DMSO (2,70 l) y se trató con trietilamina (223 ml, 1,60 mol). La mezcla se agitó a 25 °C durante 30 min y se trató con EDC-HCl (354 g, 1,85 mol) e hidrato de HOBT (283 g, 1,85 mol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 16 h. Después de la adición de trietilamina (292 ml, 2,09 mol), la mezcla se enfrió hasta 15 °C, se diluyó con agua (10,1 l) manteniendo la temperatura debajo de 30 °C, y se agitó a 19-25 °C durante 4 h. El precipitado resultante se filtró, se lavó dos veces con agua (2,70 l) y se secó al vacío para dar un producto bruto (695 g, análisis peso-peso = 78%).

25 Para la purificación adicional del producto, se efectuó recristalización. Un producto bruto (20,00 g, 34,92 mmol) se suspendió en una mezcla de etanol (190 ml) y agua (10,00 ml) y se calentó a 75 °C hasta obtener una disolución clara. La disolución se dejó enfriar a ta durante la noche. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con una mezcla de etanol (30,0 ml) y agua (30,0 ml) y se secó al vacío a 35 °C para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (14,0 g, 70% recuperación del bruto y 90% rendimiento en base al ensayo peso-peso).



Bromuro de 4-((3'-(((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-5'-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)morfolin-4-ilo (Polimorfo A): Una N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida bruta (595 g, 464 g en base

5 al ensayo de peso-peso, 810,3 mmol) se suspendió en etanol (3,33 l). Después de calentar hasta 70 °C, la mezcla se trató con 48% HBr acuoso (97 ml, 850,8 mmol) y se agitó a 70 °C durante 30 min. La disolución anaranjada-roja resultante se trató con acetato de etilo (3,33 l) manteniendo la temperatura encima de 60 °C. La mezcla se enfrió lentamente hasta ta durante 18 h. La mezcla se enfrió hasta 0 °C durante 1 h y se agitó a esa temperatura durante 5,5 h. El precipitado resultante se filtró, se lavó dos veces con acetato de etilo (1,39 l) y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (515 g, 97% de rendimiento).

10 Recristalización del Polimorfo A: Bromuro de 4-((3'-(((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-5'-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)morfolin-4-io (0,50 g, 0,77 mmol; 95,6% puro por HPLC) se suspendió en etanol (3,0 ml) y se calentó hasta 80 °C hasta obtener una disolución clara. A la disolución se le añadió MTBE (5,0 ml) lentamente. La disolución resultante se dejó enfriar hasta 18-22 °C durante 3 h y se agitó a 18-22 °C durante 15 h. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con MTBE (2 ml) y se secó al vacío para dar 0,45 g del compuesto del título (89% recuperación, 96,6% puro por HPLC). El patrón de difracción de rayos X por polvo del Polimorfo A (monohidrobromuro) se muestra en la Figura 1. La Tabla 1, a continuación, enumera los picos más significativos.

15 Tabla 1

Picos (Grados 2-teta)
3,9
10,1
14,3
17,5
18,7
20,6
20,9
21,8
22,0
23,3
23,6

Evaluación del hidrobromuro del Compuesto I y el Polimorfo A

20 Se preparó y evaluó un número de formas de sal diferentes del Compuesto I, incluidas las sales de hidrócloruro, hidrobromuro, hemisulfato, fosfato sódico, fosfato, nitrato, maleato, malonato y L-tartrato. Entre ellas, la sal de hidrobromuro (HBr) tuvo las propiedades físico-químicas más ventajosas en términos de facilidad de preparación e higroscopicidad.

25 Se llevaron a cabo estudios detallados de la base libre del Compuesto I, así como también la sal de HCl de este compuesto. Se detectaron por lo menos cinco formas cristalinas distintas a partir de la forma libre del Compuesto I durante la evaluación del polimorfo preliminar usando XRD y DSC. Debido al alto grado de variabilidad observado durante la cristalización de la forma libre, se investigaron formas cristalinas de otras sales. De las sales evaluadas, las formas de sal de monohidrócloruro, monohidrobromuro, hemisulfato, fosfato, maleato, L-tartrato y sodio fueron cristalinas. Las sales de fosfato y maleato fueron muy higroscópicas y el L-tartrato tuvo poca cristalinidad.

30 Fue difícil obtener un alto grado de cristalinidad de la sal de HCl del Compuesto I. Se obtuvo una mezcla de material cristalino y amorfo independientemente de las condiciones de cristalización. Como se muestra en la Figura 8, los datos de DSC de la sal de monohidrócloruro del Compuesto I indican algún grado de no cristalinidad con una reacción endotérmica a 190,5°C. Además, se obtuvieron los datos de sorción dinámica de vapor (DVS) para la sal

de monohidrocloreto del Compuesto I y se halló que exhibían cierta higroscopicidad: se observó un aumento de peso de 4 - 6% a 75% de humedad relativa (HR) a 25°C (Figura 18B). Esto puede atribuirse a una cierta cantidad de naturaleza no cristalina de la sal de monohidrocloreto. Véase, p. ej., la Figura 18A, que muestra un Compuesto I de trihidrocloreto amorfo. Dado que el nivel de cristalinidad no fue controlable, la sal de HCl no se consideró para posterior desarrollo.

Como se muestra en la Figura 6, el análisis DVS de la sal de sodio del Compuesto I demostró higroscopicidad significativa: se observó un aumento de peso de aproximadamente 15% a 75% de humedad relativa (HR) a 25°C. Como se muestra en la Figura 7, la sal hemisulfato del Compuesto I demostró higroscopicidad moderadamente alta: se observó un aumento de peso de 9 - 11% a 75% humedad relativa (HR) a 25°C. Esto puede atribuirse a la naturaleza altamente no cristalina del compuesto, ya que los datos de DSC de la sal de hemisulfato indican un grado muy alto de no cristalinidad sin reacción endotérmica limpia.

De estos compuestos cristalinos, el monohidrobromuro fue el más cristalino y el menos higroscópico (véanse las Figuras 1, 3 y 4). Asimismo, el monohidrobromuro es altamente estable y resiste a la generación de impurezas (la Figura 5 ilustra el análisis HPLC del Polimorfo A durante tres días a temperatura elevada. El Polimorfo A produjo impurezas mínimas durante tres días 100°C). Cabe destacar que se halló que la sal de di-HBr del Compuesto I era principalmente amorfa (Figura 2).

Dos formas cristalinas diferentes del monohidrobromuro del Compuesto I (Polimorfos A y B) se obtuvieron de diferentes sistemas disolventes y se caracterizaron usando análisis XRD, DSC y TGA-DSC. Los datos de XRD y DSC para estas dos formas cristalinas diferentes de partidas representativas del Compuesto I se exponen en la Figura 1, la Figura 3 y la 10. El Polimorfo B se caracteriza por un patrón de difracción por polvo de XRD con picos a 8,5, 10,9, 16,7, 17,4, 20,9, 22,1 y 25,7 ±0,2 grados 2 teta (véase la Figura 10). Entre estos dos, se descubrió que el Polimorfo A es no higroscópico (Figura 4). En los análisis térmicos, se observó un solo pico endotérmico con una temperatura de inicio a aproximadamente 251 °C. Además, fue evidente a partir del análisis de DSC que la recristalización del polimorfo A aumenta significativamente la cristalinidad del material (véase la Figura 3).

En múltiples operaciones a escala de laboratorio, el Polimorfo A se obtuvo de manera reproducible, y ligeros cambios en las condiciones de cristalización no resultaron en formas cristalinas diferentes.

Ensayos de enzimas PRC2 mutantes y de tipo silvestre

Materiales generales. Se adquirieron S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), bicine, KCl, Tween20, dimetilsulfóxido (DMSO) y gelatina de piel bovina (BSG) de Sigma-Aldrich con el más alto nivel de pureza posible. Se adquirió ditiotreitól (DTT) de EMD. Se adquirió ³H-SAM de American Radiolabeled Chemicals con una actividad específica de 80 Ci/mmol. Se adquirieron Flashplates de estreptavidina de 384 pocillos de PerkinElmer.

Sustratos. Péptidos representativos de residuos de histona humanos H3, 21 - 44 que contenían o bien lisina no modificada 27 (H3K27me0) o lisina dimetilada 27 (H3K27me2) se sintetizaron con un motivo de marca de afinidad-enlazador C-terminal G(K-biotina) y un recubrimiento amida C-terminal amida de 21st Century Biochemicals. Los péptidos fueron purificados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) hasta una pureza mayor a 95% y se confirmaron por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas (LC-MS). Las secuencias se exponen a continuación.

H3K27me0: ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotina)-amida (SEC ID NO: 1) H3K27me2: ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotina)-amida (SEC ID NO: 2)

Se purificaron oligonucleosomas de eritrocitos de pollo a partir de sangre de pollo, de conformidad con los procedimientos establecidos.

Complejos de PRC2 recombinante. Se purificaron complejos de PRC2 humana como complejos enzimáticos de 4 componentes co-expresados en células de *Spodoptera frugiperda* (sf9) usando un sistema de expresión de baculovirus. Las subunidades expresadas fueron EZH2 de tipo silvestre (NM_004456) o EZH2 Y641F, N, H, S o C mutantes generados a partir del constructo EZH2 de tipo silvestre, EED (NM_003797), Suz12 (NM_015355) y RbAp48 (NM_005610). La subunidad EED contenía una marca N-terminal FLAG que se utilizó para purificar todo el complejo de 4 componentes de los lisados celulares sf9. La pureza de los complejos alcanzó o excedió el 95% según lo determinado por análisis SDS-PAGE y Agilent Bioanalyzer. Las concentraciones de concentraciones stock de enzimas (en general 0,3 - 1,0 mg/ml) se determinaron usando un ensayo Bradford contra un estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

Procedimiento general para ensayos de enzimas PRC2 en sustratos peptídicos. Los ensayos se efectuaron todos en un tampón que consistía en bicine 20 mM (pH = 7,6), DTT 0,5 mM, 0,005% BSG y 0,002% Tween20, preparado el día del uso. Los compuestos en 100% DMSO (1 µl) se dispusieron en placas de fondo V de polipropileno con 384 pocillos (Greiner) usando un Platemate 2 X 3 equipado con una pipeta de 384 canales (Thermo). Se añadió DMSO (1 µl) a las columnas 11, 12, 23, 24, hileras A - H para control de señal máxima, y SAH, un producto e inhibidor de PRC2 conocido (1 µl) se añadió a las columnas 11,12, 23, 24, hileras I - P para control de señal mínima. Un cóctel

(40 µl) que contenía la enzima PRC2 de tipo silvestre y el péptido H3K27me0 o cualquiera de las enzimas mutantes Y641 y H3K27me2 se añadió por Multidrop Combi (Thermo). Los compuestos se dejaron incubar con PRC2 durante 30 min a 25 °C, luego un cóctel (10 µl) que contenía una mezcla de no radiactivo y ³H-SAM se añadió para iniciar la reacción (volumen final = 51 µl). En todos los casos, las concentraciones finales fueron las siguientes: la enzima PRC2 de tipo silvestre o mutante fue 4 nM, SAH en los pocillos de control de señal mínima fue 1 mM y la concentración de DMSO fue 1%. Las concentraciones finales del resto de los compuestos se indican en la Tabla 2 a continuación. Los ensayos cesaron por adición de SAM no radiactivo (10 µl) a una concentración final de 600 µM, que diluye el ³H-SAM hasta un nivel en el que su incorporación al sustrato peptídico ya no es detectable. Se transfirieron luego 50 µl de la reacción en la placa de polipropileno de 384 pocillos a una Flashplate de 384 pocillos, y los péptidos biotinilados se dejaron unir a la superficie de estreptavidina durante por lo menos 1h antes de lavarse tres veces con 0,1% Tween20 en una lavadora de placas Biotek ELx405. Las placas se leyeron luego en una lectora de placas PerkinElmer TopCount para medir la cantidad de péptido marcado con ³H unido a la superficie de la Flashplate, que se mide como desintegraciones por minuto (dpm) o alternativamente, se hace referencia como a los recuentos por minuto (cpm).

Tabla 2: Concentraciones finales de los componentes para cada variación del ensayo en función de la identidad de EZH2 (EZH2 mutante Y641 o de tipo silvestre)

Enzima PRC2 (indicada por identidad de EZH2)	Péptido (nM)	SAM no radiactivo (nM)	³ H-SAM (nM)
Tipo silvestre	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

Procedimiento general para el ensayo de enzimas PRC2 de tipo silvestre en sustrato de oligonucleosomas. Los ensayos se realizaron en un tampón que consistía en bicine 20 mM (pH = 7,6), DTT 0,5 mM, 0,005% BSG, KCl 100 mM y 0,002% Tween20, preparado el día del uso. Los compuestos en 100% DMSO (1 µl) se dispusieron en placas de fondo V de polipropileno con 384 pocillos (Greiner) usando una Platemate 2 X 3 equipada con una pipeta de 384 canales (Thermo). Se añadió DMSO (1 µl) a las columnas 11, 12, 23, 24, hileras A - H para el control de señal máxima, y SAH, un producto e inhibidor de PRC2 conocido (1 µl), se añadió a las columnas 11,12, 23, 24, hileras I - P para el control de señal mínima. Un cóctel (40 µl) que contenía la enzima PRC2 de tipo silvestre y oligonucleosoma de eritrocitos de pollo se añadió por Multidrop Combi (Thermo). Los compuestos se dejaron incubar con PRC2 durante 30 min a 25 °C, luego se añadió un cóctel (10 µl) que contenía una mezcla de no radiactivo y ³H-SAM para iniciar la reacción (volumen final = 51 µl). Las concentraciones finales fueron las siguientes: la enzima PRC2 de tipo silvestre fue 4 nM, SAM no radiactivo fue 430 nM, ³H-SAM fue 120 nM, oligonucleosoma de eritrocitos de pollo fue 120 nM, SAH en los pocillos control de señal mínima fue 1 mM y la concentración de DMSO fue 1%. El ensayo cesó por adición de SAM no radiactivo (10 µl) hasta una concentración final de 600 µM, que diluye el ³H-SAM hasta un nivel en el que su incorporación en el sustrato de oligonucleosoma de eritrocitos de pollo ya no es detectable. Se transfirieron luego 50 µl de la reacción en la placa de polipropileno de 384 pocillos a una Flashplate de 384 pocillos, y los nucleosomas de eritrocitos de pollo se inmovilizaron a la superficie de la placa, que luego se lavó tres veces con 0,1 % Tween20 en una lavadora de placas Biotek ELx405. Las placas se leyeron luego en una lectora de placas PerkinElmer TopCount para medir la cantidad de oligonucleosoma de eritrocitos de pollo marcado con ³H unido a la superficie de Flashplate, que se mide como desintegraciones por minuto (dpm) o alternativamente, como recuentos por minuto (cpm).

$$\% inh = 100 - \left(\frac{dpm_{comp} - dpm_{mín}}{dpm_{máx} - dpm_{mín}} \right) \times 100$$

donde dpm = desintegraciones por minuto, compd = señal en el pocillo de ensayo, y mín y máx son los respectivos controles de señal mínima y máxima.

Ajuste de CI₅₀ de cuatro parámetros

$$Y = \text{Parte inferior} + \frac{(\text{Parte superior} - \text{Parte inferior})}{1 + \left(\frac{X}{CI_{50}}\right)^{\text{Coeficiente de Hill}}}$$

en donde normalmente se permite que la parte superior y la parte inferior floten, pero pueden fijarse a 100 o 0 respectivamente en un ajuste de 3 parámetros. Normalmente se permite que el coeficiente de Hill flote, pero también se puede fijar en 1 en un ajuste de 3 parámetros. Y es el % de inhibición y X es la concentración del compuesto.

- 5 Los valores CI_{50} para los ensayos de la enzima PRC2 en sustratos peptídicos (p. ej., EZH2 de tipo silvestre y) se presentan en la siguiente Tabla 3.

Ensayo de metilación de WSU-DLCL2

- 10 Se adquirieron células de suspensión WSU-DLCL2 de DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). Medio RPMI/Glutamax, Penicilina-Estreptomocina, suero bovino fetal inactivado por calor y D-PBS se adquirieron de Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU. El tampón de extracción y el tampón de neutralización (5X) se adquirieron de Active Motif, Carlsbad, CA, EE. UU. Se adquirieron anticuerpo de conejo y anti-histona H3 de Abcam, Cambridge, MA, EE. UU. IgG anti-H3K27me3 de conejo e IgG anti-conejo conjugada a HRP se adquirieron de Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU. El sustrato TMB "Super Sensitive" fue provisto por BioFX Laboratories, Owings Mills, MD, EE. UU. La albúmina de suero bovino libre de IgG se adquirió de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU. Se adquirió PBS con Tween (10X PBST) de KPL, Gaithersburg, MD, EE. UU. Se adquirió ácido sulfúrico de Ricca Chemical, Arlington, TX, EE. UU. Se adquirieron placas ELISA Immulon de Thermo, Rochester, NY, EE. UU. Las placas de cultivo celular de fondo V se adquirieron de Corning Inc., Corning, NY, EE. UU. Las placas de polipropileno de fondo V se adquirieron de Greiner Bio-One, Monroe, NC, EE. UU.
- 15 Se mantuvieron células de suspensión WSU-DLCL2 en medio de crecimiento (RPMI 1640 enriquecido con 10% v/v suero bovino fetal inactivado por calor y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomocina) y se cultivaron a 37°C bajo 5% CO₂. Bajo condiciones de ensayo, las células se incubaron en Medio de Ensayo (RPMI 1640 enriquecido con 20% v/v suero bovino fetal inactivado por calor y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomocina) a 37°C bajo 5% CO₂ en un agitador de placas.
- 20 Las células WSU-DLCL2 se sembraron en medio de ensayo a una concentración de 50.000 células por ml en una placa de cultivo celular con fondo V de 96 pocillos con 200 µl por pocillo. El compuesto (1 µl) de placas de origen de 96 pocillos se añadió directamente a una placa celular de fondo en V. Las placas se incubaron en un agitador de placas de titulación a 37°C, 5% CO₂ por 96 horas. Después de cuatro días de incubación, las placas se centrifugaron a 241 x g por cinco minutos y se aspiró suavemente el medio de cada pocillo de la placa celular sin alterar el sedimento celular. El sedimento se re-suspendió en 200 µl de DPBS y las placas se centrifugaron nuevamente a 241 x g durante cinco minutos. El sobrenadante se aspiró y se enfrió (4°C). Se añadió tampón de extracción (100 µl) por pocillo. Las placas se incubaron a 4°C en un agitador orbital durante dos horas. Las placas se centrifugaron a 3427 x g x 10 minutos. El sobrenadante (80 µl por pocillo) se transfirió a su respectivo pocillo en una placa de polipropileno con fondo V de 96 pocillos. El tampón de neutralización 5X (20 µl por pocillo) se añadió a la placa de polipropileno con fondo v que contenía sobrenadante. Las placas de polipropileno con fondo en V que contenían la preparación de histona en bruto (CHP) se incubaron en un agitador orbital x cinco minutos. Se añadieron preparaciones de histona en bruto (2 µl por pocillo) a cada pocillo respectivo en placas ELISA de 96 pocillos duplicadas que contenían 100 µl de tampón de recubrimiento (1X PBS + BSA 0,05% p/v). Las placas se sellaron e incubaron durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con 300 µl por pocillo 1X PBST. Los pocillos se bloquearon durante dos horas con 300 µl por pocillo de diluyente de ELISA ((PBS (1X) BSA (2% p/v) y Tween20 (0,05% v/v)). Las placas se lavaron tres veces con 1X PBST. Para la placa de detección de histona H3, se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpo anti-Histona H3 (Abcam, ab1791) diluido 1:10.000 en diluyente de ELISA. Para la placa de detección de trimetilación de H3K27, se añadieron 100 µl por pocillo de anti-H3K27me3 diluido 1:2000 en diluyente de ELISA. Las placas se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl 1X PBST por pocillo. Para la detección de histona H3, se añadieron 100 µl de anticuerpo de IgG anti-conejo conjugado a HRP diluido hasta 1:6000 en diluyente de ELISA por pocillo. Para la detección de H3K27me3, se añadieron 100 µL por pocillo de anticuerpo IgG anti-conejo conjugado a HRP diluido a 1:4000 en diluyente de ELISA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces con 1X PBST 300 µl por pocillo. Se añadieron 100 µl por pocillo de sustrato TMB. Las placas de histona H3 se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las placas de H3K27me3 se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción cesó con ácido sulfúrico 1N (100 µl por pocillo). La absorbancia por cada placa se leyó a 450 nm.

Primero se determinó la relación para cada pocillo por:

$$\left(\frac{\text{valor H3K27me3 OD450}}{\text{valor histona H3 OD450}} \right)$$

Cada placa incluyó ocho pocillos control de tratamiento con DMSO solamente (inhibición mínima) así como también ocho pocillos control para inhibición máxima (pocillos de fondo).

5 El promedio de relación para cada tipo de control se calculó y usó para determinar el porcentaje de inhibición de cada pocillo de ensayo en la placa. El compuesto de prueba se diluyó en serie tres veces en DMSO por un total de diez concentraciones de prueba, comenzando a 25 µM. Se determinó el porcentaje de inhibición y se generaron las curvas de CI₅₀ usando pocillos duplicados por concentración del compuesto. Los valores CI₅₀ para este ensayo se presentan en la Tabla 3 a continuación.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left(\frac{(\text{Índice muestra de prueba individual}) - (\text{Índice promedio de fondo})}{(\text{Índice de inhibición mínima}) - (\text{Índice promedio de fondo})} \right) \cdot 100$$

10 Análisis de proliferación celular

Se adquirieron células de suspensión WSU-DLCL2 de DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). El medio RPMI/Glutamax, Penicilina-Estreptomicina, suero bovino fetal inactivado por calor se adquirieron de Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU. Las placas de polipropileno de fondo en V y 384 pocillos se adquirieron de Greiner Bio-One, Monroe, NC, EE. UU. Las placas blancas opacas de 15 384 pocillos para cultivo celular se adquirieron de Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU. Se adquirió Cell-Titer Glo® de Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU. Se adquirió la lectora de placas SpectraMax M5 de Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EE. UU.

20 Las células de suspensión WSU-DLCL2 se mantuvieron en medio de crecimiento (RPMI 1640 enriquecido con 10% v/v suero bovino fetal inactivado por calor y se cultivaron a 37°C bajo 5% CO₂. Bajo condiciones de ensayo, las células se incubaron en medio de ensayo (RPMI 1640 enriquecido con 20% v/v suero bovino fetal inactivado por calor y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina) a 37°C bajo 5% CO₂,

25 Para la evaluación del efecto de los compuestos en la proliferación de la línea celular WSU-DLCL2, las células de crecimiento exponencial se dispusieron en placas blancas opacas de 384 pocillos a una densidad de 1250 célula/ml en un volumen final de 50 µl de medio de ensayo. Una placa con origen del compuesto se preparó efectuando 3 diluciones en serie por triplicado de nueve puntos en DMSO, comenzando a 10 mM (la concentración superior final del compuesto en el ensayo fue 20 µM y el DMSO fue 0,2%). Una alícuota de 100 nl de la placa stock del compuesto se añadió a su respectivo pocillo en la placa celular. El control del 100% de inhibición consistió en células tratadas con una concentración final de 200 nM de estaurosporina y el control de 0% de inhibición consistió en células tratadas con DMSO. Después de la adición de los compuestos, las placas de ensayo se incubaron durante 6 días a 30 37°C, 5% CO₂, humedad relativa > 90% durante 6 días. La viabilidad celular se midió por cuantificación del ATP presente en los cultivos celulares, añadiendo 35 µl de reactivo Cell Titer Glo® a las placas celulares. La luminiscencia se leyó en SpectraMax M5. La concentración que inhibe la viabilidad celular por 50% se determinó usando un ajuste de 4 parámetros de las curvas de dosis y respuesta normalizadas. Los valores CI₅₀ para este ensayo se presentan en la Tabla 3 a continuación.

35 Tabla 3

	péptido EZH2 IC50 v2	Y641F CI50	WSU prolif CI50	WSU ELISA CI50
Compuesto I (base libre)	0,01299	0,01107	0,369	0,29

Estudio *in vivo* – Línea celular de linfoma humano SUDHL10

Ratones

40 Los ratones hembra Fox Chase SCID® (CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrI, Beijing Vitalriver Laboratory Animal Co., LTD) tenían 6 - 8 semanas de vida y un peso corporal (BW) en el intervalo de 16,0-21,1 g en el D1 del estudio. Los animales recibieron alimento a voluntad con agua (estéril) y alimento en gránulos secos esterilizado por radiación. Los ratones fueron alojados en lechos de mazorca de maíz en micro-aislantes estáticos en un ciclo de luz de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y 40-60% de humedad. Todos los procedimientos cumplen con las recomendaciones de 45 la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*) con

respecto a restricciones, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de alimentación y líquidos, y atención veterinaria.

Cultivo de células tumorales

5 La línea celular de linfoma humano SUDHL10 se obtuvo de DSMZ y se mantuvo en el CRO como cultivos en suspensión en medio RPMI-1640 que contenía 100 unidades/ml de penicilina G sal de sodio, 100 g/ml de estreptomycin y 10% de suero bovino fetal. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejido en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire. Solamente los cultivos debajo del pasaje 12 se usaron para implantación

Implantación de tumores *in vivo*

10 Se recogió la línea celular de linfoma humano SUDHL10 durante el crecimiento de fase logarítmica media y se resuspendió en PBS con 50% Matrigel™ (BD Biosciences). Cada ratón recibió 1 x 10⁷ células (0,2 ml suspensión celular) subsiguientemente en el flanco derecho. Los tumores se midieron en dos dimensiones para vigilar el crecimiento a medida que el volumen medio alcanzaba el intervalo de 80-120 mm³ deseado. El tamaño del tumor, en mm³, se calculó a partir de:

15
$$\text{Volumen del tumor} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

en donde *w* = ancho y *l* = largo, en mm, del tumor. El peso del tumor se puede estimar con la hipótesis de que 1 mg es equivalente a 1 mm³ del volumen del tumor. Después de 10 días los ratones con 72-256 mm³ tumores se clasificaron en cuatro grupos (n=16 por grupo) con volúmenes del tumor medios de 173-179 mm³.

Artículos de prueba

20 El hidrobromuro del Compuesto I se conservó a temperatura ambiente y se protegió de la luz. En cada día del tratamiento, se prepararon formulaciones frescas del compuesto suspendiendo el polvo en 0,5% carboximetilcelulosa sódica (NaCMC) y 0,1% Tween® 80 en agua desionizada. El vehículo, 0,5% NaCMC y 0,1% Tween® 80 en agua desionizada, se usó para tratar el grupo control en el mismo esquema. Las formulaciones se conservaron fuera de la luz a 4 °C antes de la administración.

25 Plan de tratamiento

Los ratones se trataron con dosis del hidrobromuro del Compuesto I en el intervalo de 125 - 500 mg/kg y con esquemas BID (dos veces al día, cada 12 h) durante 28 días por gavage oral. Cada dosis se administró en un volumen de 0,2 ml/20 g ratón (10 ml/kg), y se ajustó según el último peso registrado de los animales individuales. El día 25, se seleccionaron los 8 ratones con los tumores más pequeños por grupo para una valoración final de la demora del crecimiento del tumor (observación hasta 60 días). El resto de los animales se sometieron a eutanasia el día 28, 3h después de la última dosis para recolección del tumor.

30 Análisis de la mediana del volumen del tumor (MTV) e inhibición del crecimiento del tumor (TGI)

La eficacia del tratamiento se determinó para cada grupo el último día del tratamiento. Se determinó la MTV(n), la mediana del volumen del tumor para el número de animales, n, evaluables el último día. El porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor (%TGI) se puede definir de varias maneras. Primero, la diferencia entre la MTV(n) del grupo control designado y la MTV(n) del grupo tratado con el fármaco se expresa como porcentaje de la MTV(n) del grupo control:

$$\%TGI = \left(\frac{MTV(n)_{control} - MTV(n)_{tratado}}{MTV(n)_{control}} \right) \times 100$$

40 Otra forma de calcular el %TGI consiste en tomar en cuenta el cambio del tamaño del tumor desde el día 1 hasta el día n, en donde n es el último día del tratamiento.

$$\%TGI = \left(\frac{\Delta MTV_{control} - \Delta MTV_{tratado}}{\Delta MTV_{control}} \right) \times 100$$

$$\Delta MTV_{control} = MTV(n)_{control} - MTV(1)_{control}$$

$$\Delta MTV_{tratado} = MTV(n)_{tratado} - MTV(1)_{tratado}$$

45

Análisis de demora del crecimiento del tumor

Se mantuvieron vivos ocho ratones por grupo después del último día del tratamiento para análisis de demora del crecimiento del tumor. Los tumores se valoraron dos veces por semana, y cada animal de prueba fue sacrificado cuando su neoplasia alcanzó el volumen de valoración final de 2000 mm³ o el último día pre-especificado del estudio, lo que sucediera primero. Se efectuó un análisis de supervivencia Kaplan Meier. Toxicidad

- 5 Los animales se pesaron a diario en los días 1-5, y luego dos veces por semana hasta completar el estudio. Los ratones fueron examinados frecuentemente para detectar signos visibles de cualquier efecto colateral adverso relacionado con el tratamiento, los cuales fueron documentados. La toxicidad aceptable para la dosis máxima tolerada (MTD) se definió con una pérdida de peso corporal (BW) promedio de menos de 20% durante la prueba, y no más de 10% de mortalidad debida a muertes TR. Una muerte se clasificó como TR si fue atribuible a los efectos colaterales del tratamiento según lo evidenciado por los signos clínicos y/o la autopsia, o debido a causas desconocidas durante el periodo de administración. Una muerte se clasificó como NTR si hubo evidencia de que la muerte no estuvo relacionada con efectos colaterales del tratamiento. Las muertes NTR durante el intervalo de dosis habitualmente se categorizarían como NTRa (debido a un accidente o un error humano) o NTRm (debido a la diseminación del tumor confirmada por autopsia por invasión y/o metástasis). Los animales tratados por la vía oral que murieron por causas desconocidas durante el periodo de administración se pueden clasificar como NTRu cuando el desempeño grupal no respalda una clasificación TR y no es factible la autopsia para descartar un error en la dosis.

Muestreo

- 20 El día 28, los ocho ratones con los tumores más grandes se sometieron a una muestra en un modo pre-especificado para evaluar la inhibición de la diana en los tumores. Los tumores se extirparon de los ratones especificados bajo condiciones libres de RNAsa y se bisecaron. Se midió el peso total del tumor. El tejido tumoral congelado de cada animal se conservó en N₂ líquido y se pulverizó con un mortero.

Análisis estadístico y gráfico

- 25 Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con Prism 3.03 (GraphPad) para Windows. Para ensayar la significación estadística entre el control y los grupos tratados durante todo el transcurso del tratamiento, se empleó una prueba ANOVA de mediciones repetidas seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los resultados de los informes de Prism se exponen como no significativo (ns) en $P > 0,05$, significativo (simbolizado por "**") en $0,01 < P < 0,05$, muy significativo ("**") en $0,001 < P < 0,01$ y extremadamente significativo ("****") en $P < 0,001$. Para el grupo del estudio de demora de crecimiento del tumor, se presentó el porcentaje de animales en cada grupo que sigue en el estudio frente a tiempo en un gráfico de supervivencia Kaplan-Meier.

Extracción de histona

- 35 Para el aislamiento de histonas, se homogeneizaron 60-90 mg de tejido de tumor en 1,5 ml de tampón de extracción nuclear (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 25 mM, 1% Triton X-100, 8,6% Sacarosa, más un comprimido de inhibidor de proteasa de Roche 1836145) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se recogieron los núcleos por centrifugación a 600 g por 5 minutos a 4° C y se lavaron una vez en PBS. Se eliminó el sobrenadante y las histonas se extrajeron durante una hora, con agitación en vórtex cada 15 minutos, con ácido sulfúrico frío 0,4 N. Los extractos se aclararon por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos a 4°C y se transfirieron a un tubo microcentrífugo nuevo que contenía 10x volumen de acetona enfriada con hielo. Las histonas precipitaron a -20° C por 2 horas durante la noche se sedimentaron por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en agua.

40 ELISA

- Las histonas se prepararon en concentraciones equivalentes en tampón de recubrimiento (PBS+0,05%BSA) produciendo 0,5 ng/ul de muestra, y 100 ul de la muestra o el estándar se añadieron por duplicado a 2 placas ELISA de 96 pocillos (Thermo LabSystems, Immulon 4HBX #3885). Las placas se sellaron e incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3x con 300 ul/pocillo de PBST (PBS+0,05% Tween 20; 10X PBST, KPL #51-14-02) en una lavadora de placas Bio Tek. Las placas se bloquearon con 300 ul/pocillo de diluyente (PBS+2%BSA+0,05% Tween 20), se incubaron a TA durante 2 horas y se lavaron 3x con PBST. Todos los anticuerpos se diluyeron en diluyente. Se añadieron a cada placa 100 ul/pocillo de anti-H3K27me3 (CST #9733, 50% stock de glicerol 1:1,000) o anti-total H3 (Abcam ab1791, 50% glicerol 1:10,000). Las placas se incubaron por 90 min a TA y se lavaron 3x con PBST. Se añadieron 100 ul/pocillo de anti-Rb-IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 7074) 1:2.000 a la placa H3K27Me3 y 1:6.000 a la placa H3 y se incubó durante 90 min a TA. Las placas se lavaron 4X con PBST. Para detección, se añadieron 100 ul/pocillo de sustrato TMB (BioFx Laboratories, #TMBS) y las placas se incubaron en la oscuridad a TA durante 5 min. La reacción cesó con 100 ul/pocillo de H₂SO₄ 1N. La absorbancia a 450 nm se leyó en una lectora de microplacas SpectaMax M5.

Resultados:

- 55 Los ratones que portaban xenoinjertos de tumor SUDHL10 se trataron con el hidrobromuro del Compuesto I en la dosis máxima tolerada de 500 mg/kg BID y fracciones del MTD (½ y ¼ MTD). Todas las dosis se toleraron bien durante 28 días sin ninguna pérdida de peso importante. Hubo una muerte relacionada con el tratamiento en el

grupo de 500 mg/kg el día 15, debido a un error en la administración. Todas las dosis resultaron en la inhibición del crecimiento del tumor en comparación con el vehículo en el día 28 (Tabla 4), y los grupos BID de 250 mg/kg y 500 mg/kg BID indujeron regresiones (TGI > 100%).

5 Tabla 4:

Resumen de los valores de inhibición de crecimiento del tumor inducida por el hidrobromuro del Compuesto I en xenoinjertos SUDHL10		
Grupo	% TGI desde el día 1	% TGI desde el día 8
125 mg/kg BID	54	57
250 mg/kg BID	101	113
500 mg/kg BID	104	115

10 La Figura 12A muestra el crecimiento de tumores de xenoinjerto SUDHL10 con el transcurso del tiempo para los distintos grupos de tratamiento. El grupo BID de 125 mg/kg no fue significativamente distinto del grupo del vehículo según ANOVA de mediciones repetidas y post-prueba de Dunnett, pero el tamaño del tumor terminal medio en el día 28 fue significativamente más pequeño que el del grupo vehículo (ANOVA de 2 vías con post-prueba de Bonferroni, $p < 0,0001$). La administración de 250 mg/kg BID y 500 mg/kg BID del hidrobromuro del Compuesto I durante 28 días indujo respuestas de regresión comparables, ya que los pesos de los tumores terminales en el día 28 fueron similares para esos 2 grupos (Figura 12B).

15 Las histonas aisladas de tumores recogidas el día 28 (3h después de la última dosis) se sometieron a análisis ELISA para niveles de H3K27me3 globales. La Figura 13 muestra un claro descenso dependiente de la dosis de la marca de metilo H3K27me3 con el tratamiento del hidrobromuro del Compuesto I. Esta figura muestra la metilación H3K27me3 global en tumores SUDHL10 de ratones tratados con el hidrobromuro del Compuesto I durante 28 días.

20 El día 25, se eligieron ocho ratones por grupo con los tumores más pequeños para evaluar en un estudio de demora del crecimiento del tumor. Se evaluó el re-crecimiento de tumores después del cese de la administración de la dosis en el día 28. Los ratones fueron sacrificados cuando sus tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm³ o el día 60 (lo que sucediera primero). Estos datos se usaron para efectuar un análisis de supervivencia Kaplan Meier. La Figura 14A muestra que el re-crecimiento del tumor fue claramente dependiente de la dosis, y todos los ratones tratados con la dosis más alta de 500 mg/kg BID por 28 días sobrevivieron hasta el día 60. Solamente 2 ratones debieron ser sacrificados en el grupo de 250 mg/kg antes del día 60. Los ratones en el grupo de 125 mg/kg tuvieron un claro beneficio de supervivencia frente a los ratones tratados con vehículo, con un incremento en la mediana de supervivencia de 15,5 días (Figura 14B).

Efecto anti-cáncer del hidrobromuro del Compuesto I sobre el modelo de xenoinjerto de ratón Pfeiffer de linfoma difuso de células grandes B humano

30 El monohidrobromuro del Compuesto I se ensayó por su actividad antineoplásica en el modelo de xenoinjerto de ratón Pfeiffer, que es un modelo de xenoinjerto de linfoma difuso de células grandes B. A ratones NSG hembra de 5 semanas de vida (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) se les implantaron subcutáneamente 20 a 25 mg de fragmentos de tumor. El tratamiento se inició aproximadamente 31 días después de la implantación del tumor, cuando los tumores promedio alcanzaron aproximadamente 365 mm³. El esquema de tratamiento se describe en la Tabla 5.

35 Tabla 5. Esquema de administración

Grupo	Núm. de animales	Tratamiento	Ruta y esquema
A	9	Vehículo (0,5% Metil Celulosa, 0,1% Tween-80)	PO; qdx28
B	9	34,2 mg/kg Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx28

Grupo	Núm. de animales	Tratamiento	Ruta y esquema
C	9	114 mg/kg Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx28
D	9	342 mg/kg Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx28
E	9	1140 mg/kg Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx12 [§]

§ Debido a cuestiones de tolerabilidad del compuesto, solamente se administraron 12 dosis diarias a este grupo.

Se efectuó un seguimiento del volumen del tumor en todo el experimento. El volumen del tumor se midió dos veces por semana después del comienzo del tratamiento. La carga del tumor (mg = mm³) se calculó a partir de mediciones calibradas con la fórmula para el volumen de un elipsoide prolato (LxW²)/2 en donde L y W son las respectivas mediciones de longitud y ancho ortogonal (mm).

El día 1 fue el día del primer tratamiento, y el día 28 fue el día del último tratamiento. Este estudio finalizó 36 días después de la última dosis, así que el día 64 fue el día de finalización del estudio. Los criterios principales de valoración utilizados para evaluar la eficacia en este estudio fueron las regresiones completas de los tumores (CR), los tamaños de los tumores entre los grupos y el porcentaje de inhibición del tumor al final del estudio. Una respuesta completa se definió como una reducción del tamaño del tumor hasta un tamaño no detectable (< 20mm³) al final del estudio. Los valores para porcentaje de inhibición del tumor se calcularon a partir de la fórmula $[1 - (\Delta T / \Delta C)] \times 100$, en donde ΔT y ΔC son cambios en el valor del tumor medio (Δ crecimiento) para cada grupo tratado (T) y vehículo control (C). T₀ y C₀ (un día antes de la primera dosis) se usaron para el volumen inicial del tumor. Adicionalmente, los volúmenes de los tumores que se tomaron un día después de la última dosis (T₂₉ y C₂₉) se usaron para el cálculo de ΔT y ΔC . Cuando el valor fue de más de 100%, se concluyó como 100%. La fórmula utilizada para el cálculo de porcentaje de inhibición del tumor se expone a continuación.

$$\text{Porcentaje de inhibición del tumor} = \left[1 - \frac{T_{29} - T_0}{C_{29} - C_0} \right] \times 100 \%$$

Durante el periodo de tratamiento, se descubrió que los animales no pueden tolerar el tratamiento diario de 1142 mg/kg del hidrobromuro del Compuesto I y tres animales en este grupo (grupo E) debieron ser sacrificados después de la primera semana de tratamiento debido a una pérdida de más de 20% del peso corporal inicial. En consecuencia, la administración del fármaco para este grupo cesó después de 12 dosis. Los animales en otros tres grupos de administración de la dosis, excepto un animal en el grupo D (342 mg/kg de hidrobromuro del Compuesto I), toleraron bien el tratamiento de 28 días con pérdida de peso corporal mínima. El peso corporal relativo de los ratones se graficó en la Figura 15. El peso corporal de los animales obtenido el día 0 se usó como el peso corporal inicial en el gráfico.

El hidrobromuro del Compuesto I demostró potente y duradera actividad antineoplásica en el modelo de Pfeiffer con 100% de tasa de CR en tres de cuatro grupos de administración (Tabla 6). Asimismo, no se observó el re-crecimiento del tumor incluso 36 días después del cese del tratamiento. Esto sugiere que todas las células tumorales fueron inactivadas durante el tratamiento. Si bien se observó el re-crecimiento del tumor en el grupo con la dosis más baja (grupo B, 34,2 mg/kg), se observó una clara actividad de estasis del tumor durante el periodo de tratamiento (Figura 16). El tumor solamente comenzó a crecer tras el cese del tratamiento (Figura 16). Este resultado indica que la actividad de estasis del tumor observada en el grupo B es en realidad una actividad inducida por el artículo de prueba.

Tabla 6. Tabla con resumen de resultados

Grupo	Tratamiento	CR	TV (desviación estándar media)	Porcentaje de inhibición del tumor	Valor P ^ε
A	Vehículo	0	2882±2190	n/a	n/a
B	34,2 mg/kg Comp I (HBr)	0	497±287	93%	P<0,05

ES 2 617 379 T3

Grupo	Tratamiento	CR	TV (desviación estándar media)	Porcentaje de inhibición del tumor	Valor P [€]
C	114 mg/kg Comp I (HBr)	9	0	100%	P<0,05
D	342 mg/kg Comp I (HBr)	8 [£]	0	100%	P<0,05
E	1140 mg/kg Comp I (HBr)	6 [¥]	0	100%	P<0,05

[€] Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett (software Prism versión 5,02, Lake Forest, CA).

[£] 1 El animal fue sacrificado el día 36 debido a bajo peso corporal.

[¥] 3 Los animales fueron sacrificados los días 7, 9 y 11, individualmente debido a bajo peso corporal.

REIVINDICACIONES

1. Hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida.
2. El compuesto según la reivindicación 1, que es un monohidrobromuro.
- 5 3. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho compuesto es cristalino.
4. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto está sustancialmente libre de impurezas.
5. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto es un sólido cristalino sustancialmente libre de hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida amorfo.
- 10 6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Un método para preparar el compuesto según la reivindicación 1, que comprende combinar N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.
- 15 8. El polimorfo A del hidrobromuro de N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida.
9. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados y aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 20 10. El polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 17,5 +/- 0,3 grados y aproximadamente 22,0 +/- 0,3 grados 2-teta.
11. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, aproximadamente 14,3 +/- 0,3 grados, aproximadamente 18,7 +/- 0,3 grados, aproximadamente 23,3 +/- 0,3 grados y aproximadamente 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 25 12. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 5 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 30 13. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 6 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 35 14. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 7 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 40 15. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 8 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 45 16. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 9 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 50 17. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene por lo menos 10 picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.

18. El polimorfo según la reivindicación 8, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-teta a aproximadamente 3,9 +/- 0,3 grados, 10,1 +/- 0,3 grados, 14,3 +/- 0,3 grados, 17,5 +/- 0,3 grados, 18,7 +/- 0,3 grados, 20,6 +/- 0,3 grados, 20,9 +/- 0,3 grados, 21,8 +/- 0,3 grados, 22,0 +/- 0,3 grados, 23,3 +/- 0,3 grados y 23,6 +/- 0,3 grados 2-teta.
- 5 19. El polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-18, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1.
20. El polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-19, en donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X por polvo sustancialmente de acuerdo con la Tabla 1.
- 10 21. El polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-20, en donde el polimorfo exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial que tiene un pico característico expresado en unidades de °C a una temperatura de 255 +/- 5°C.
22. El polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-21, en donde el polimorfo exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial sustancialmente de acuerdo con la Figura 3.
- 15 23. Un método para preparar el polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-22, que comprende combinar N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.
24. Un método para recrystalizar el polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-22, que comprende las siguientes etapas: (a) disolver el Polimorfo A en un primer disolvente, y (b) añadir un segundo disolvente, de modo tal que dicho polimorfo se recrystalice.
- 20 25. El método según la reivindicación 24, en donde el primer disolvente es etanol, y el segundo disolvente es MTBE.
26. El método según la reivindicación 16, que comprende (a) disolver el Polimorfo A en etanol, (b) calentar la mezcla, (c) añadir MTBE a la mezcla, formar un precipitado que comprende dicho polimorfo, y filtrar el precipitado de modo tal que dicho polimorfo se recrystalice.
- 25 27. Una composición farmacéutica que comprende el polimorfo según una cualquiera de las reivindicaciones 8-22, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
28. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, un polimorfo según cualquiera de las reivindicaciones 8-22 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 27 para uso en un método para tratar el cáncer.
- 30 29. Un compuesto, un polimorfo o una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 28, en donde el cáncer es linfoma no Hodgkin, linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células grandes B (DLBCL) o cáncer de mama.
- 35 30. Un método para preparar N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida, que comprende someter a reacción ácido 5-(Etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico (5) con una sal de 3-(aminometil)-4,6-dimetil-dihidro-piridin-2(1H)-ona.

Polimorfo A

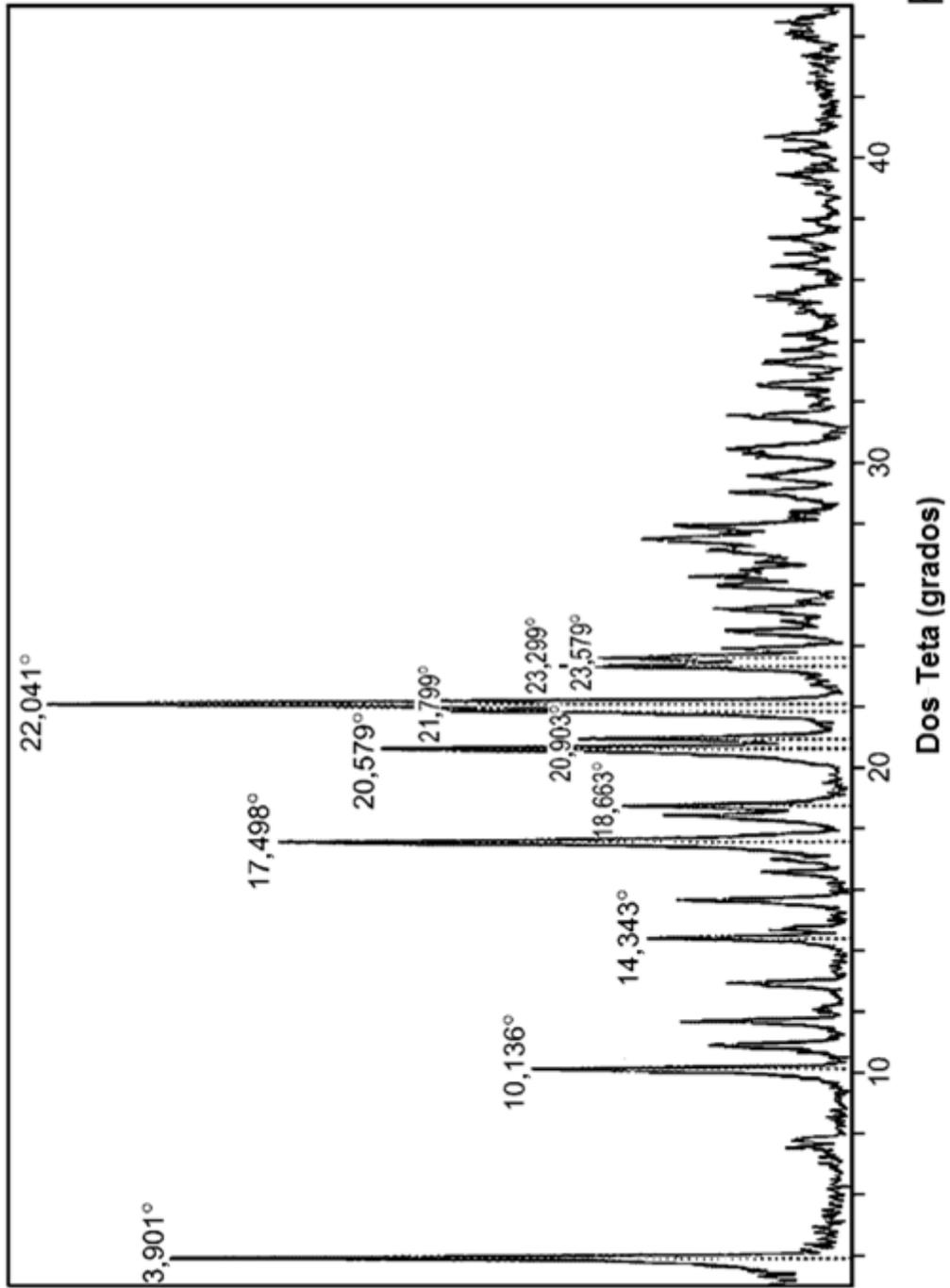


FIG. 1

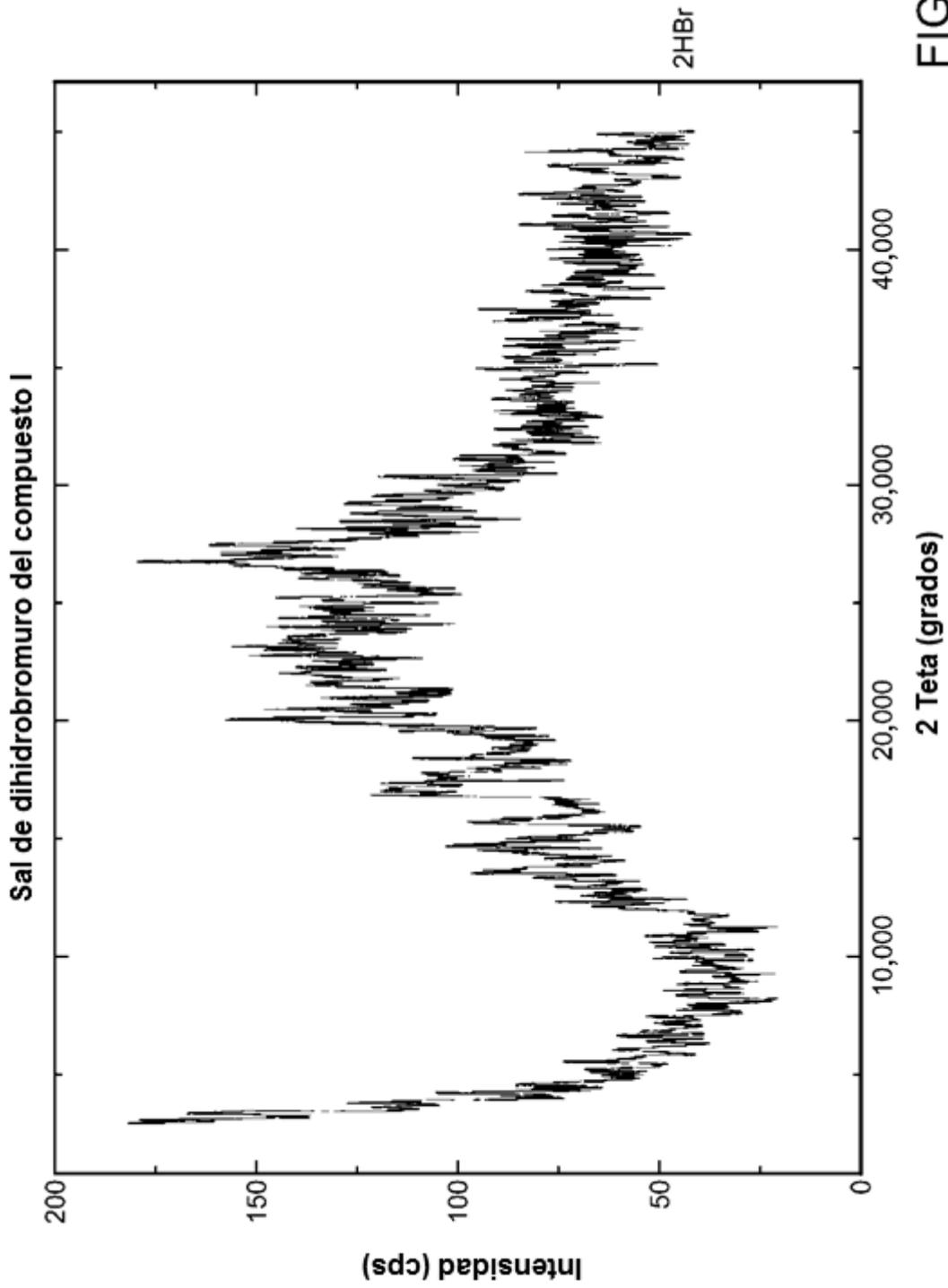


FIG. 2

Polimorfo A

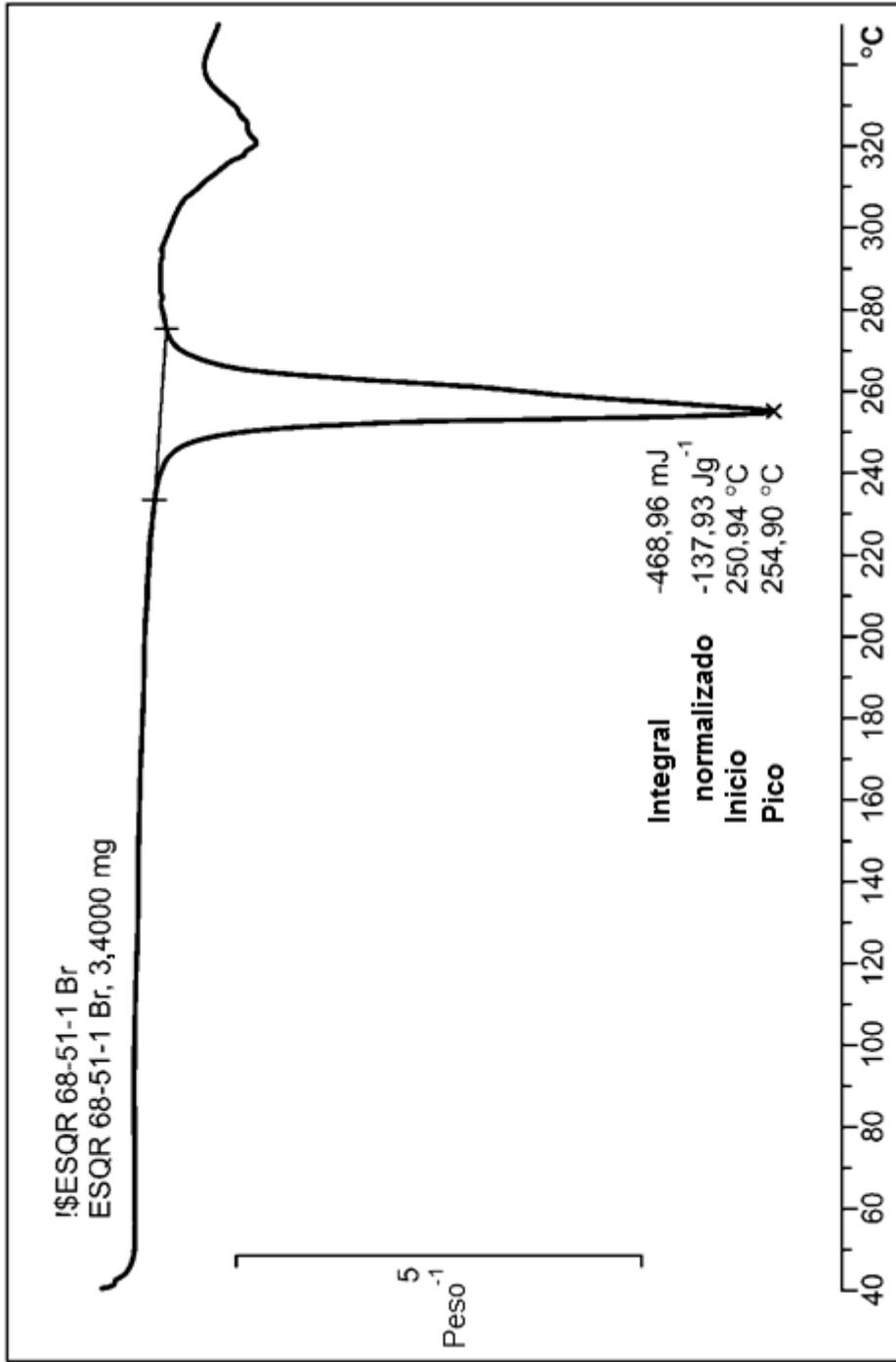


FIG. 3

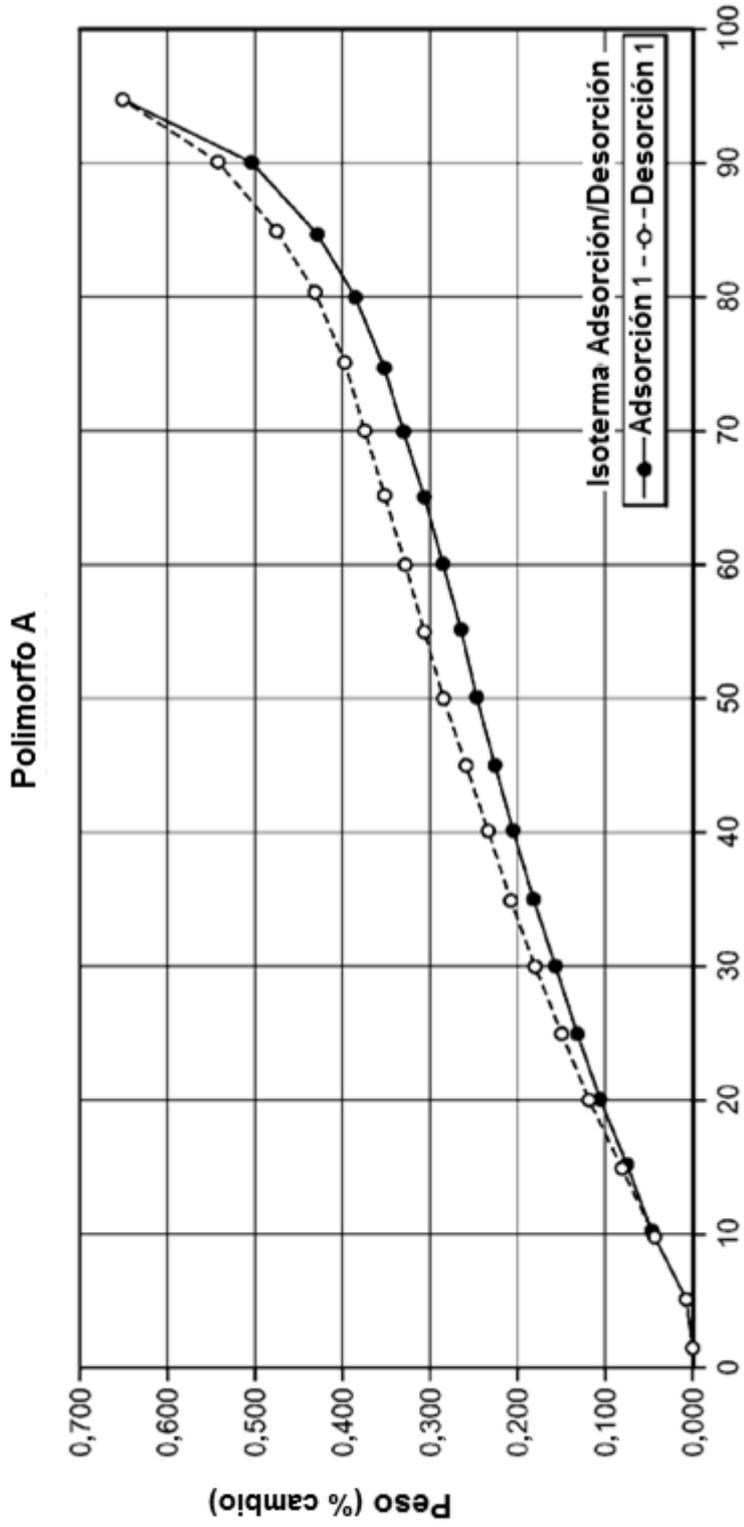


FIG. 4

Tiempo	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 dias
Peso base libre-%	100,0	98,6	97,5	94,0
Peso HBr-%	100,0	99,1	97,7	98,3

Tiempo	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 dias
Peso base libre-%	98,3	97,9	97,9	97,3
Área HBr-%	98,8	98,6	98,5	98,5

Polimorfo A

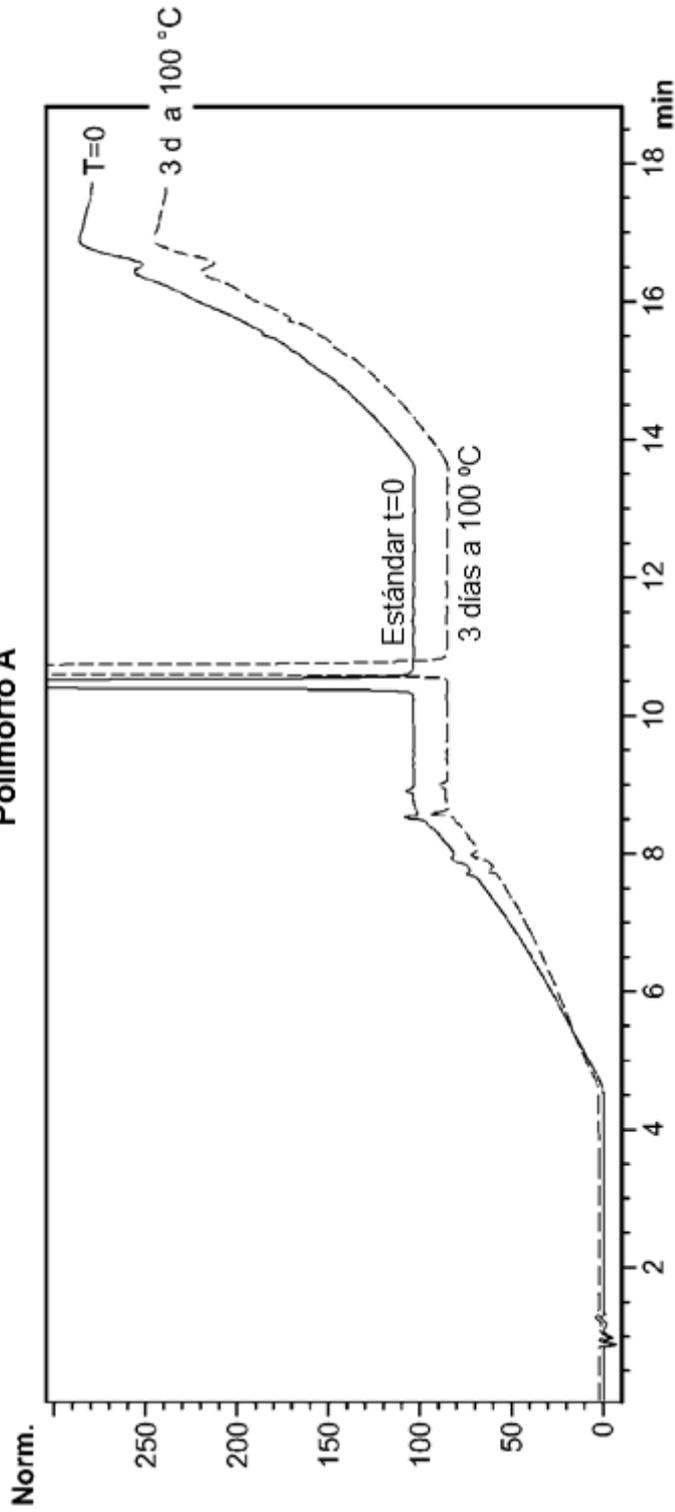


FIG. 5

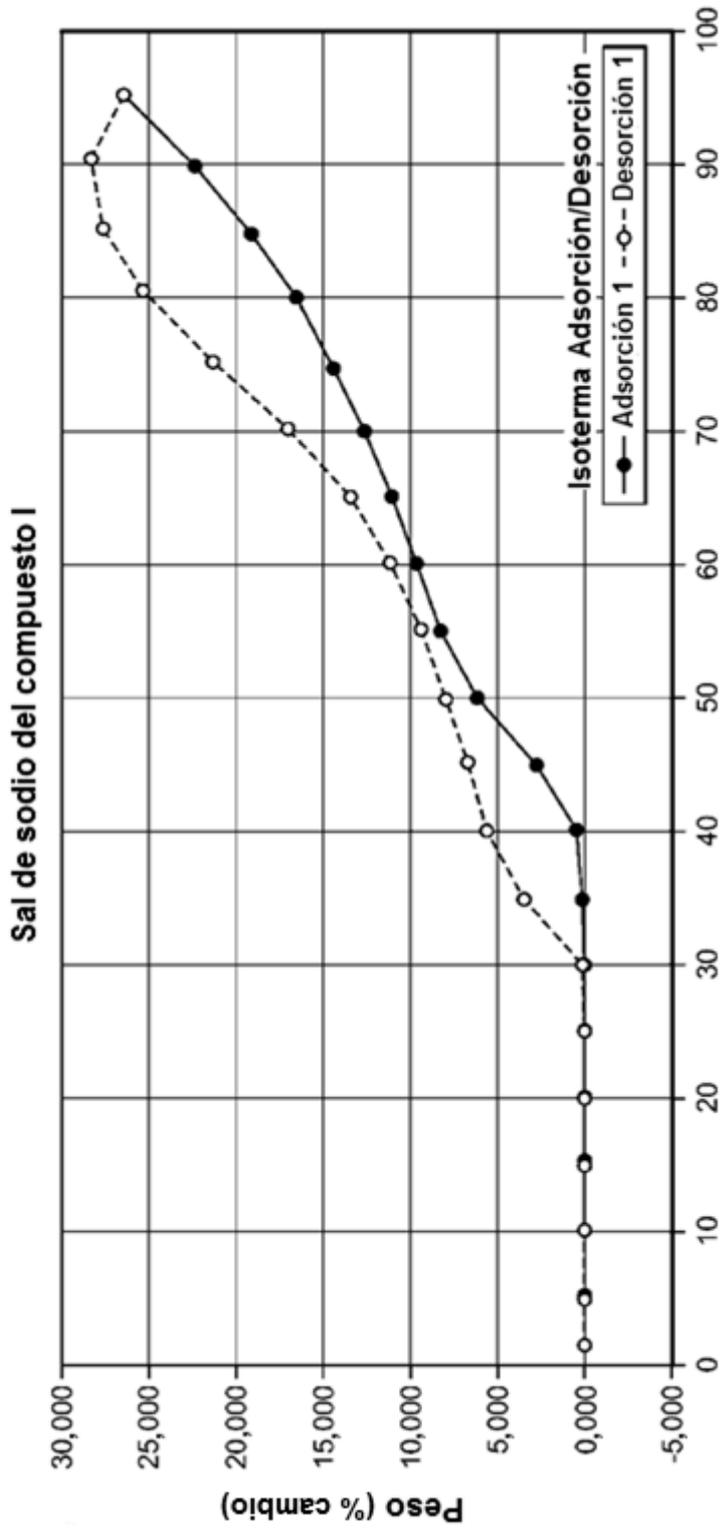


FIG. 6

HR de la muestra (%)
Comienzo de recopilación de datos: 08-08-2011, 03:17 PM
Nombre de la muestra: Hemisulfato ESQR
Lote de la muestra: 68-39-1
Nombre del archivo: Iso-08-08-2011-15-13-32.ls~
Operador: vt
Instrumento: SGA 100
N/S: 2003-128

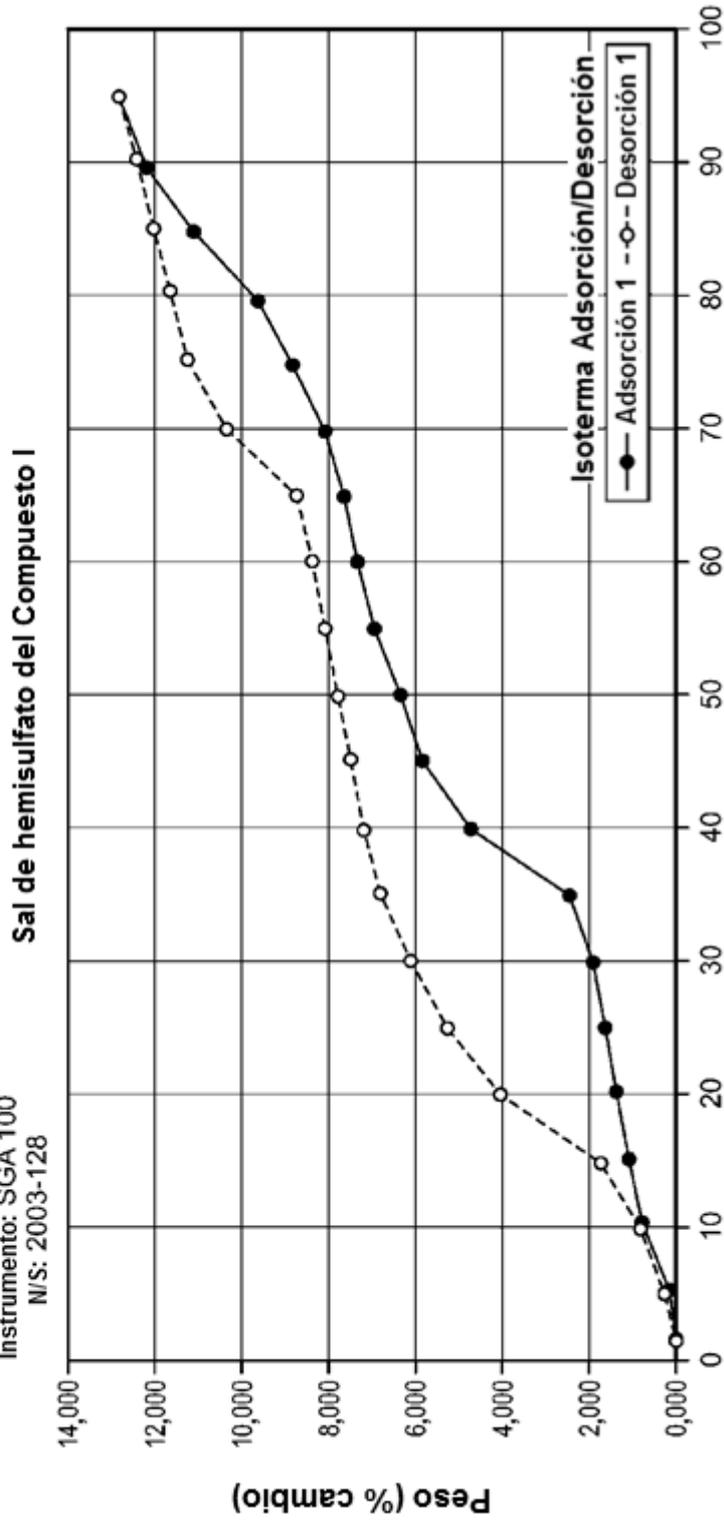


FIG. 7

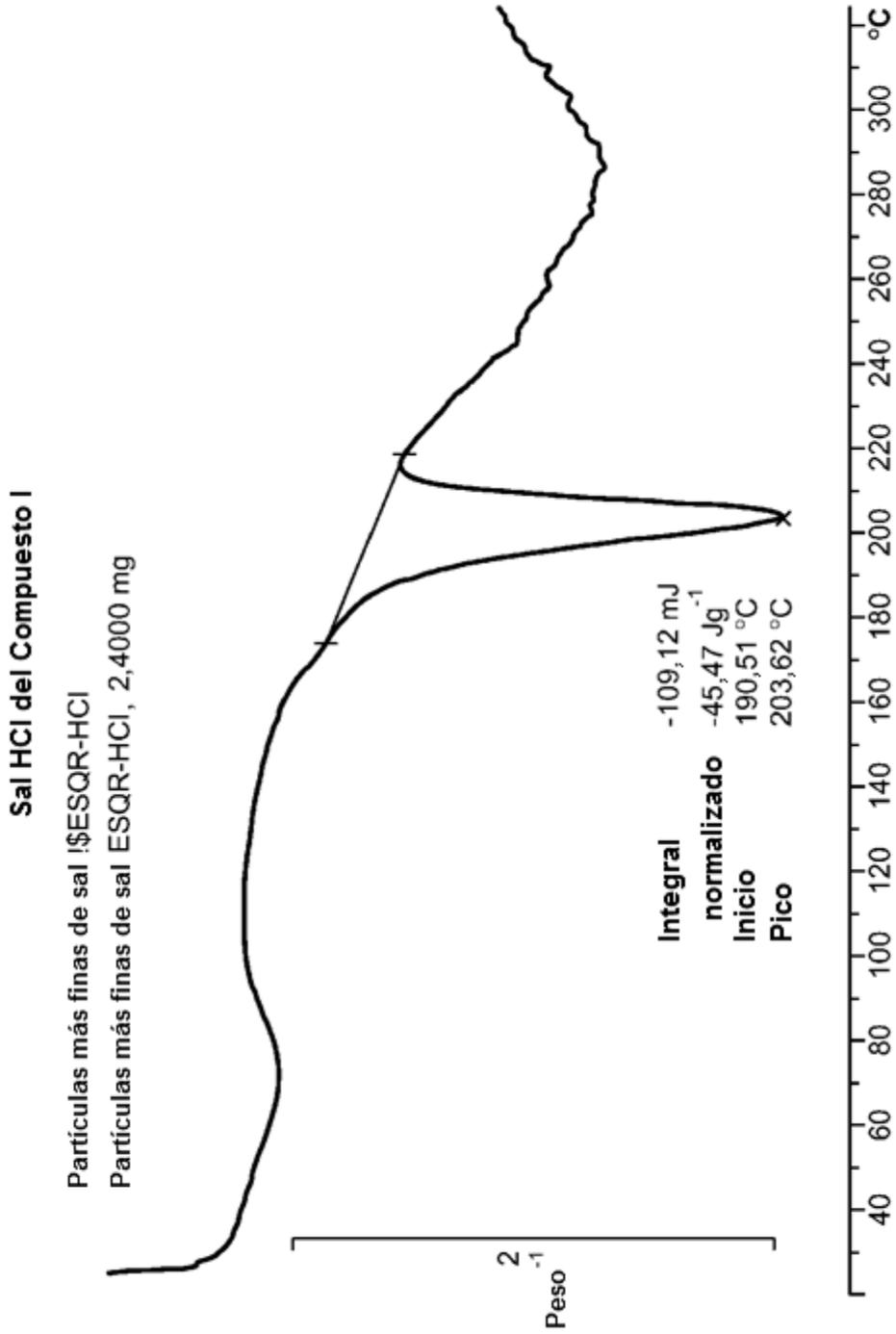


FIG. 8

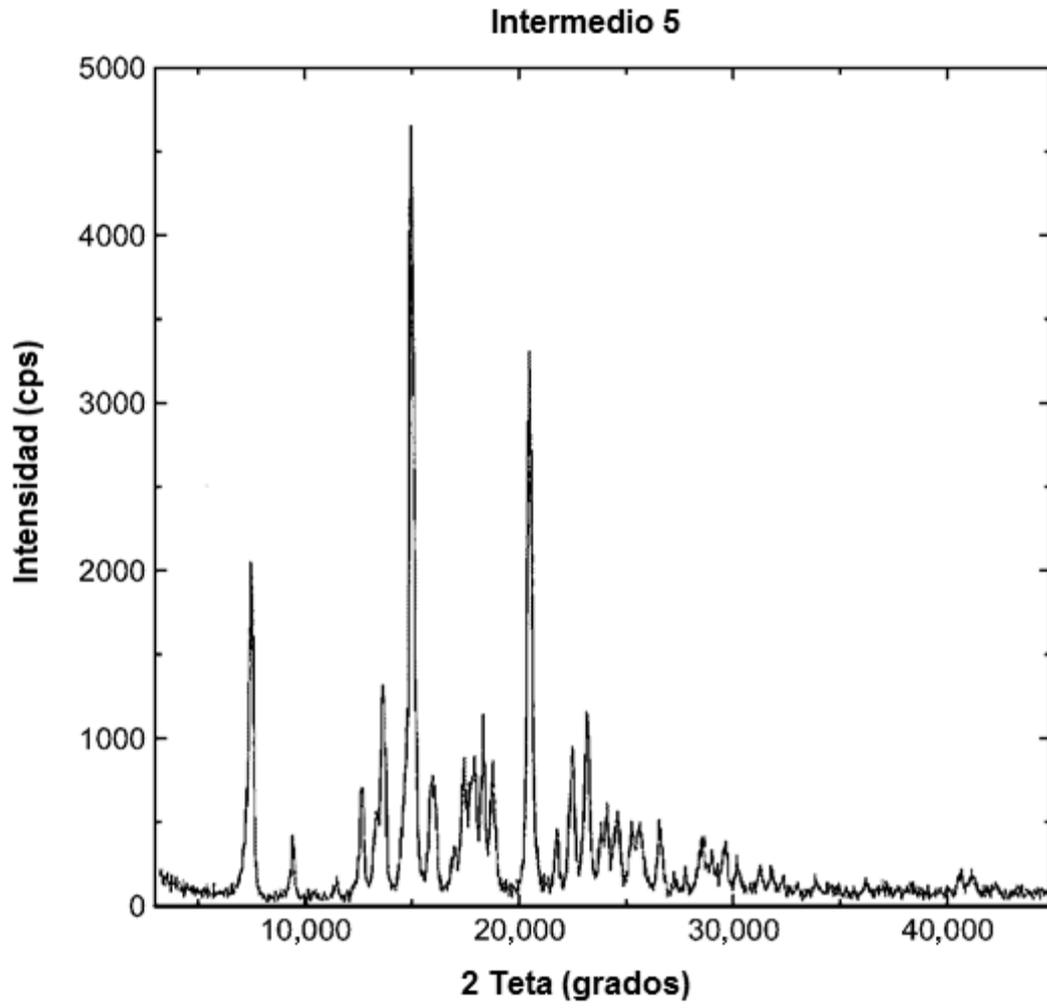


FIG. 9

Polimorfo B

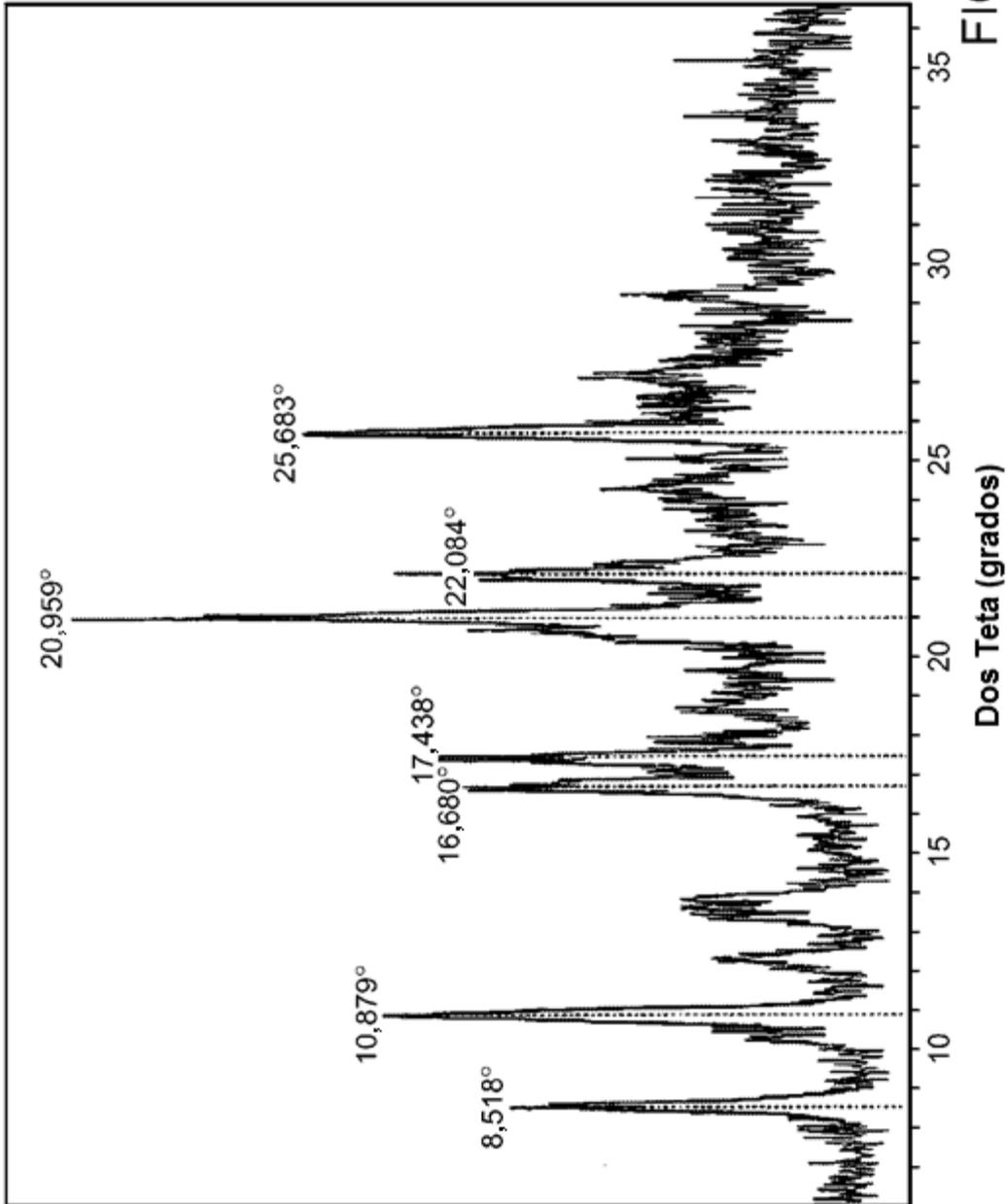


FIG. 10

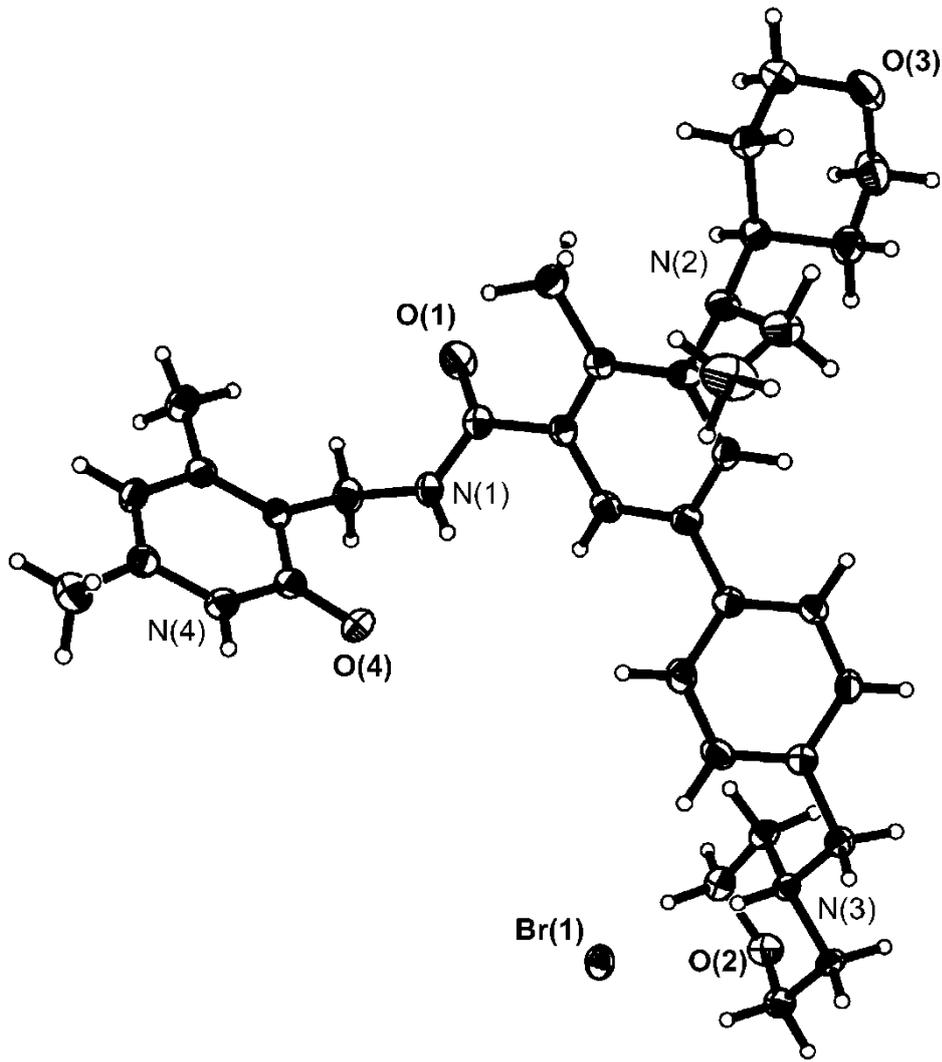


FIG. 11

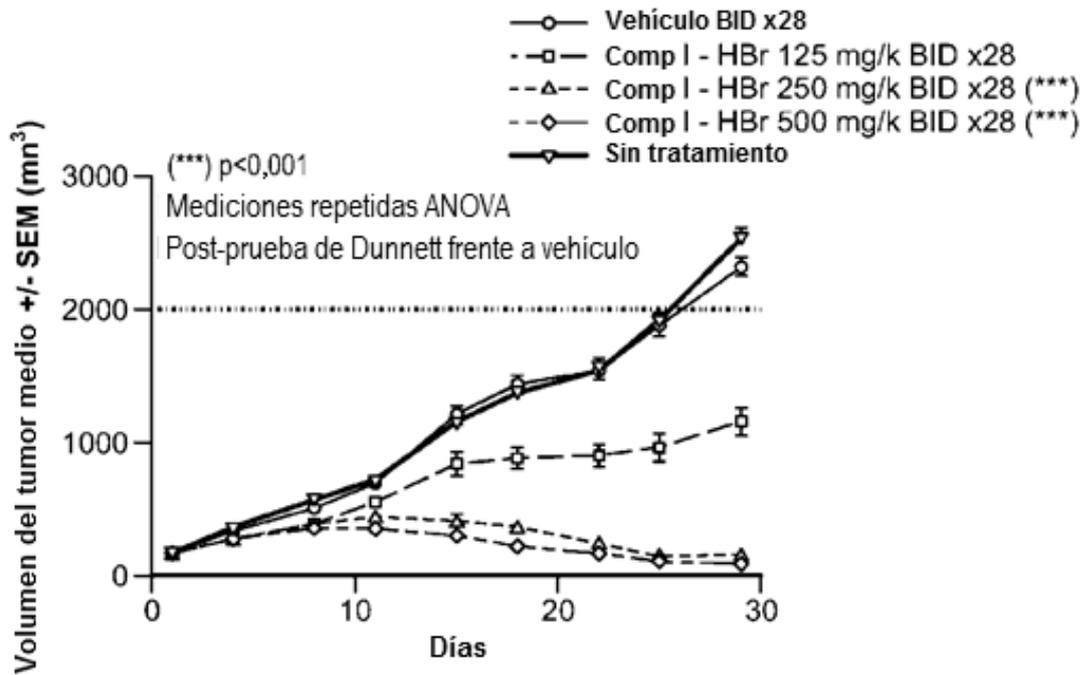


FIG. 12A

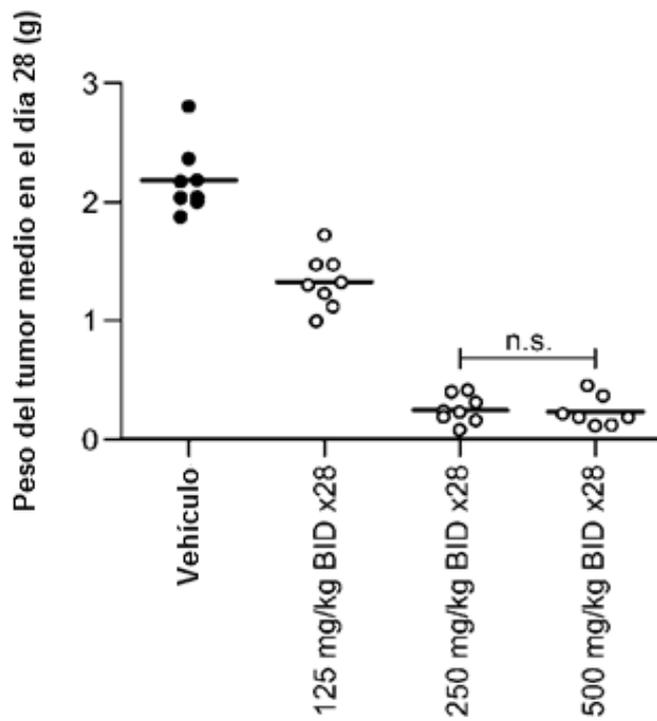


FIG. 12B

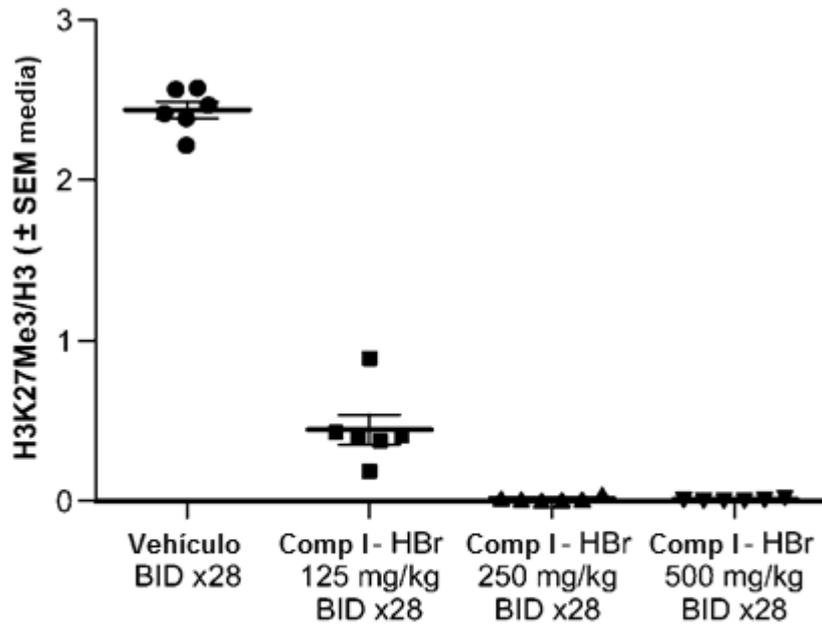


FIG. 13

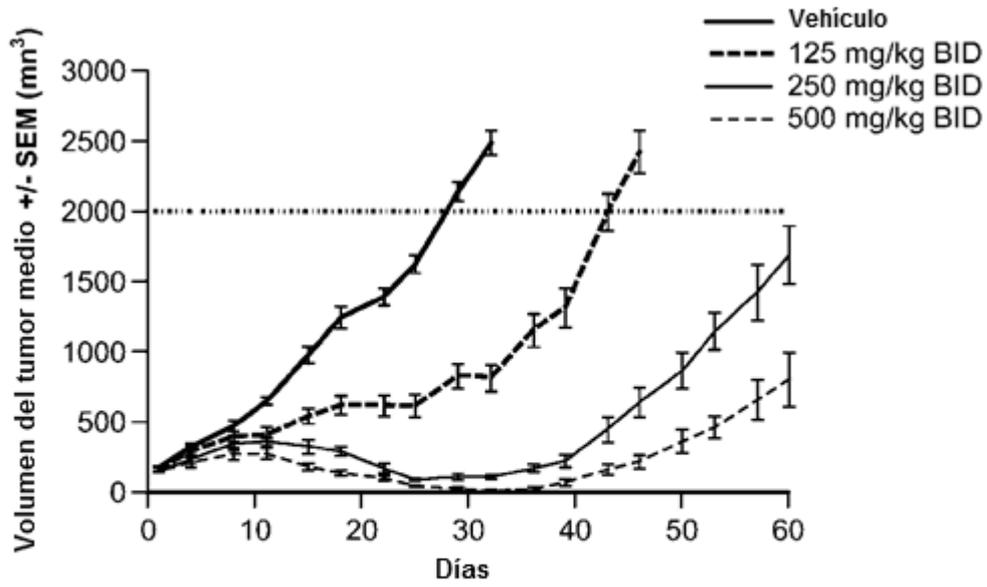


FIG. 14A

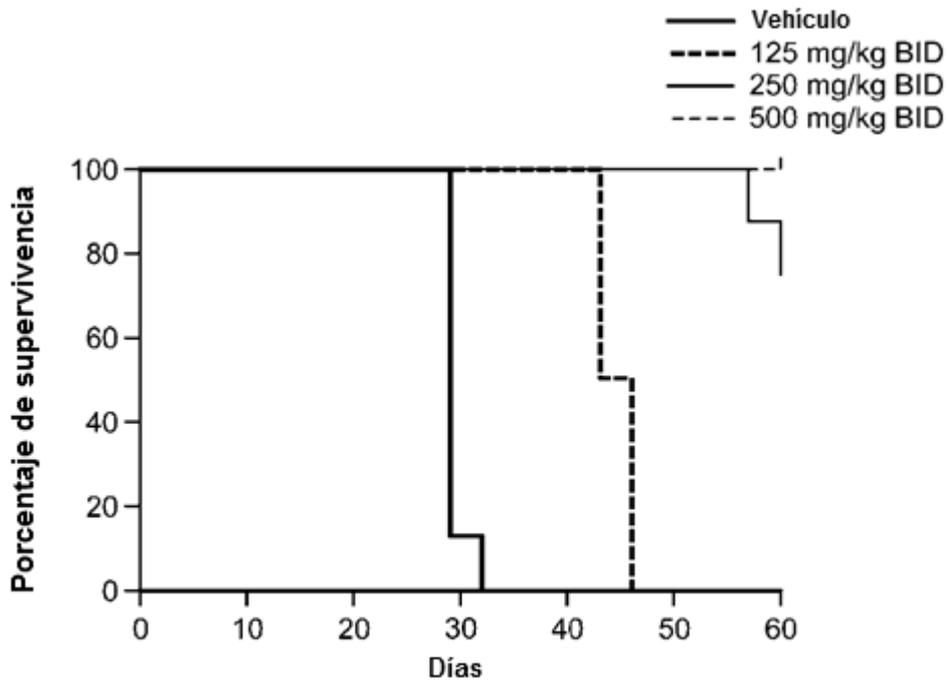


FIG. 14B

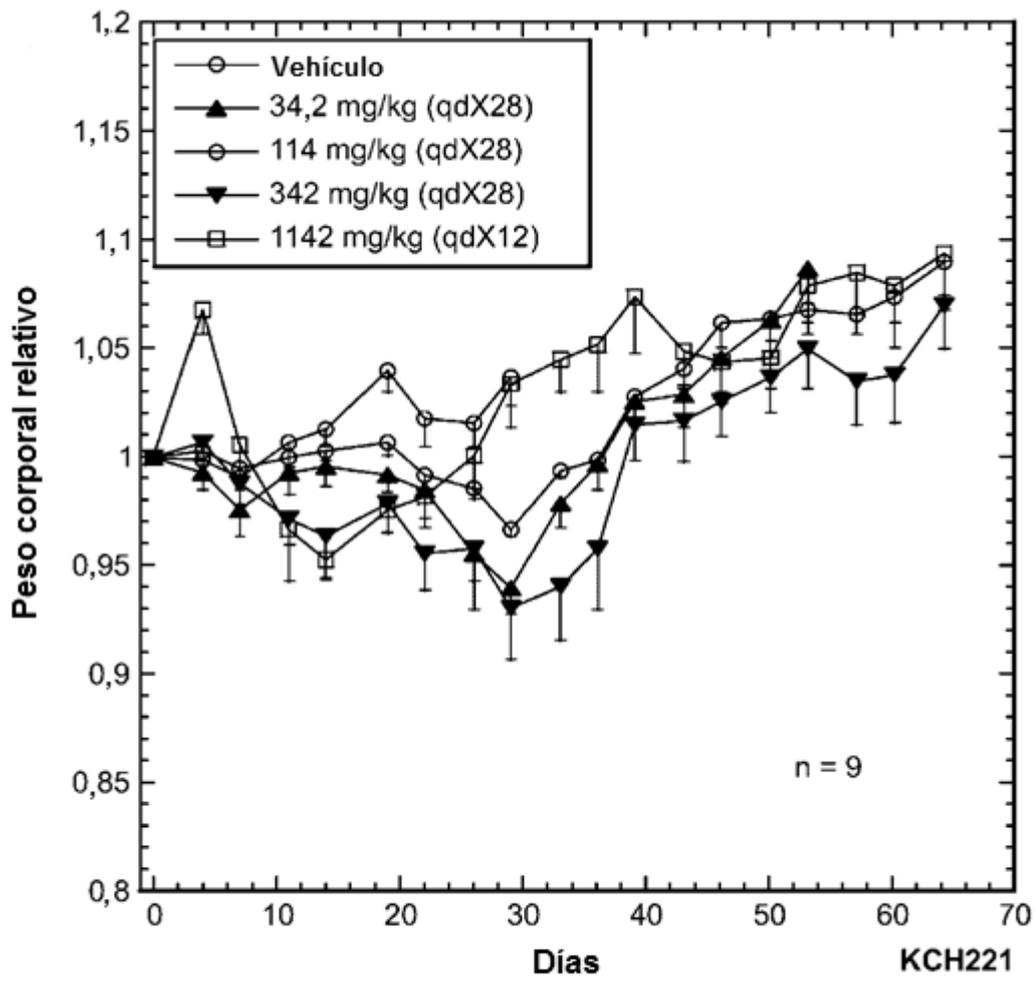


FIG. 15

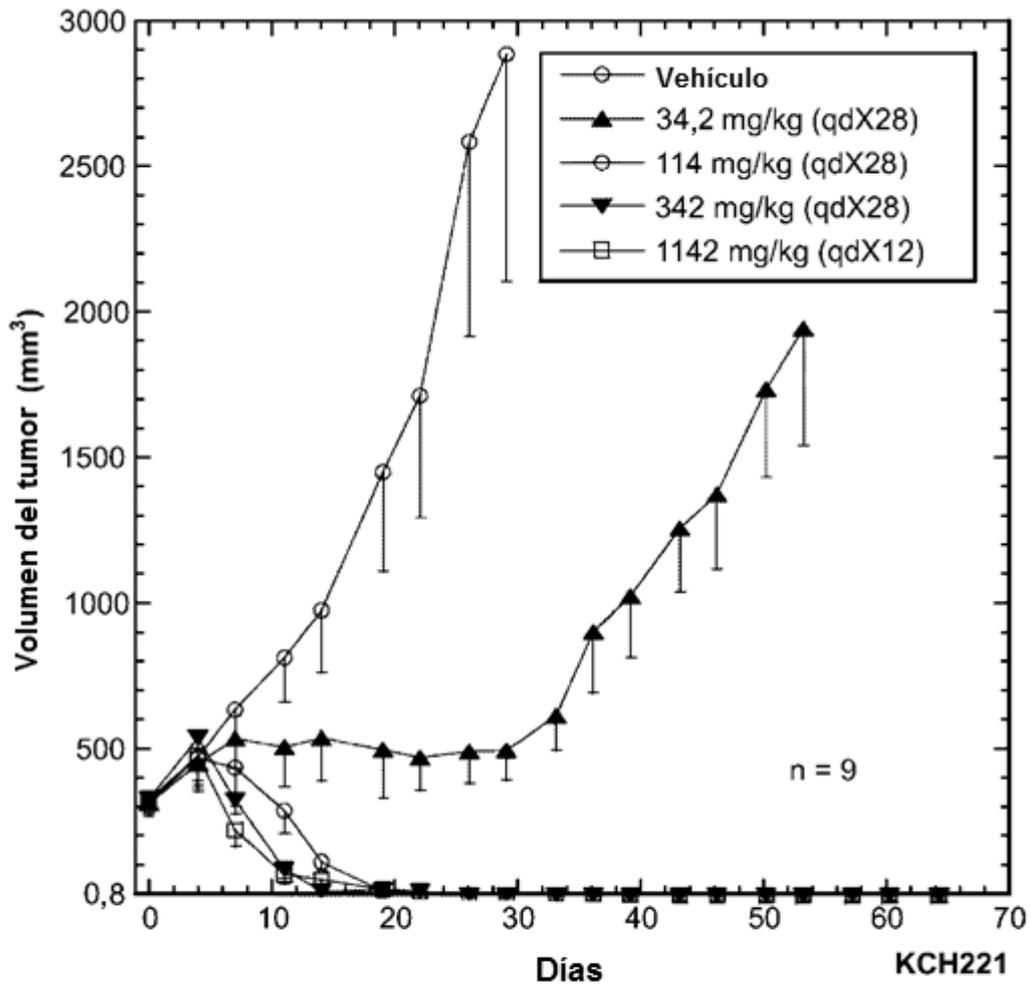


FIG. 16

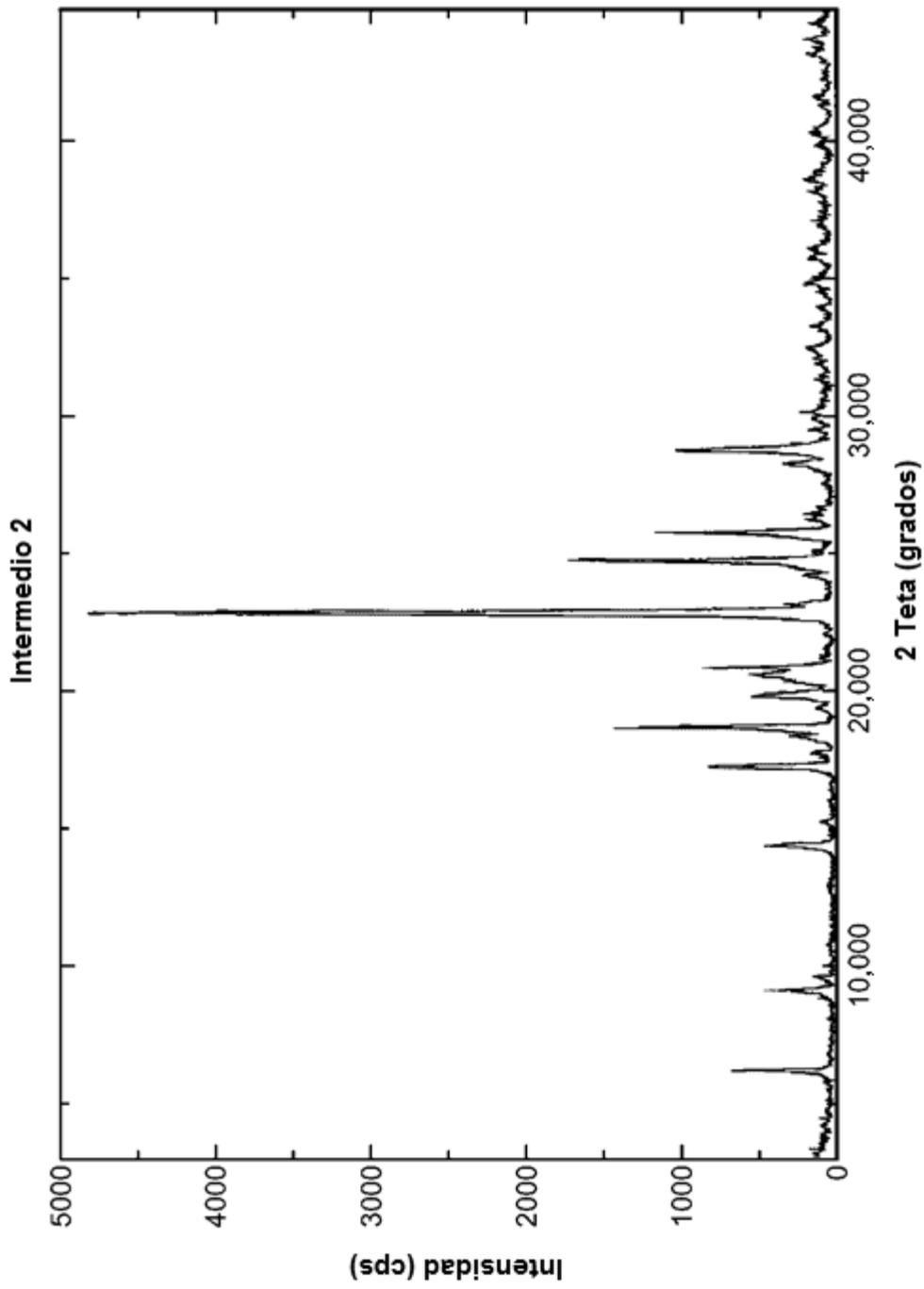


FIG. 17

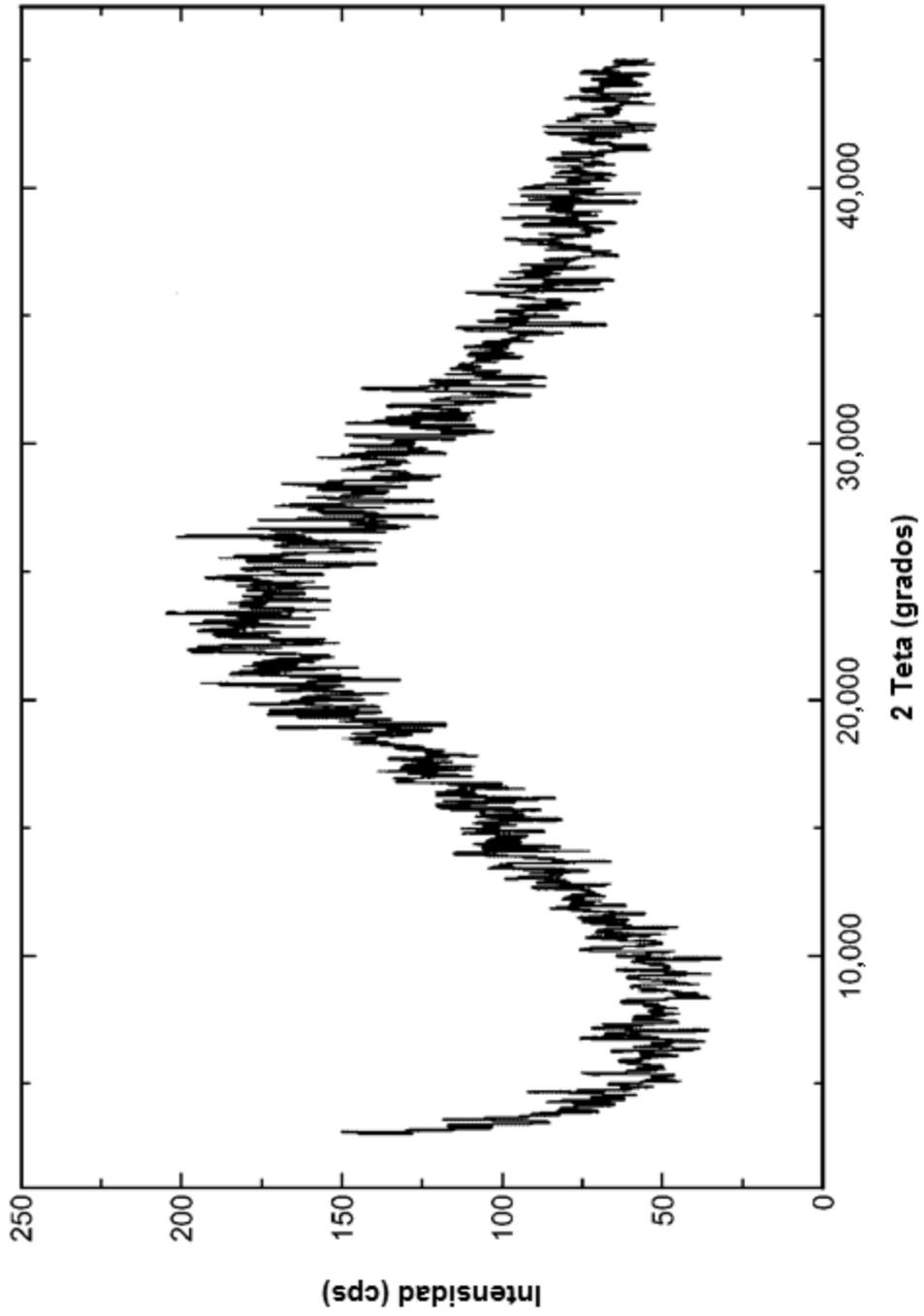


FIG. 18A

HR de la muestra (%)
 Comienzo de recopilación de datos: 08-04-2011, 10:53 AM
 Nombre de la muestra: Sal ESQR HCI
 Lote de la muestra: "
 Nombre del archivo: iso-08-04-2011-10-49-30.is~
 Operador: vti
 Instrumento: SGA 100
 N/S: 2003-128

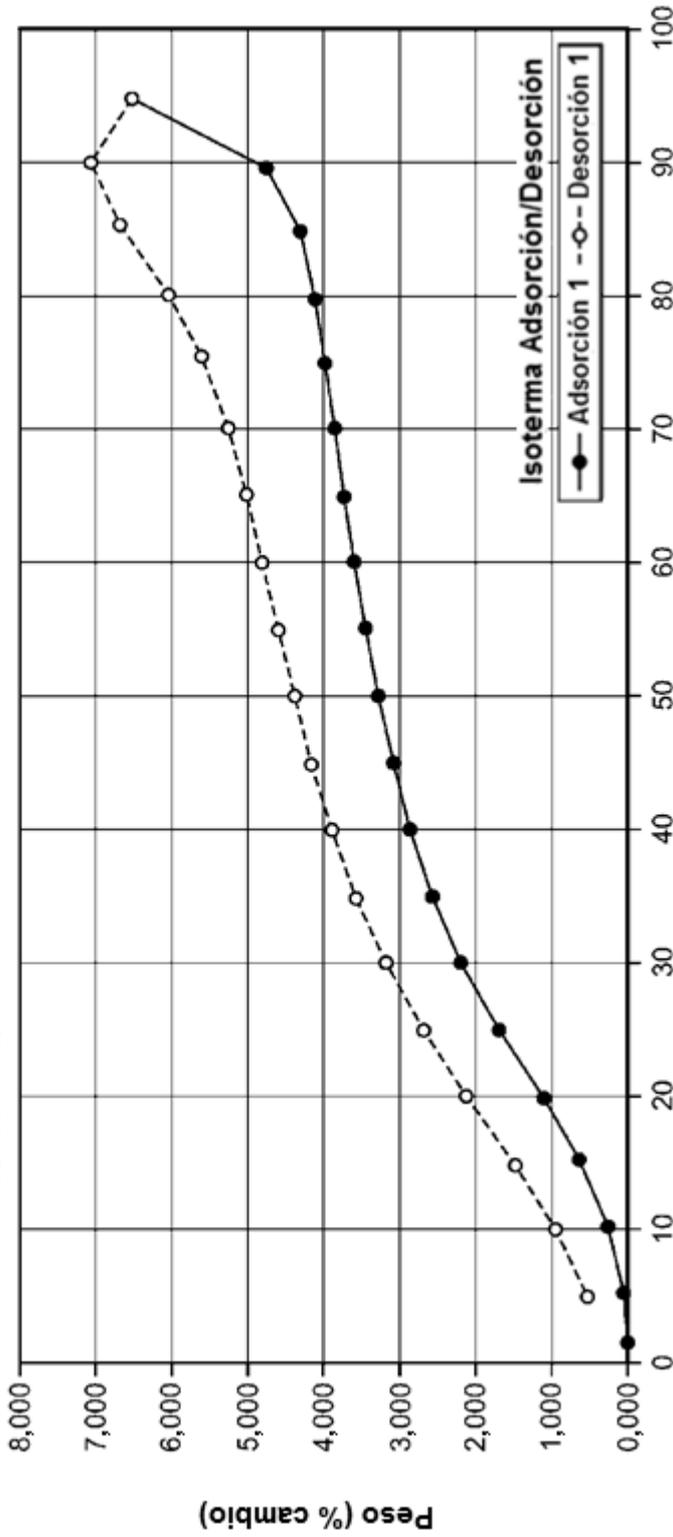


FIG. 18B