

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 161**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 31/437** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2014 PCT/GB2014/051607**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191726**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2014 E 14727036 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 3004090**

54 Título: **Compuestos químicos**

30 Prioridad:

**28.05.2013 US 201361827951 P**

**13.12.2013 US 201361915685 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2018**

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)**

**SE-151 85 Södertälje, SE**

72 Inventor/es:

**AKHTAR, NADIM;  
BRADBURY, ROBERT, HUGH;  
BUTTAR, DAVID;  
CURRIE, GORDON, STUART;  
DE SAVI, CHRISTOPHER;  
DONALD, CRAIG, SAMUEL;  
NORMAN, RICHARD, ALBERT;  
OSBORNE, MATTHEW;  
RABOW, ALFRED, ARTHUR;  
REDFEARN, HEATHER, MARIE;  
WILLIAMS, HELEN, ELIZABETH y  
YAVARI, NEDA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 654 161 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

## Compuestos químicos

5 La invención se refiere a ciertos derivados indólicos novedosos, o sales farmacéuticamente aceptables de estos, que poseen actividad contra el cáncer y, por lo tanto, son potencialmente útiles en métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal. La invención también se refiere a procesos para la producción de dichos derivados indólicos, a composiciones farmacéuticas que los contienen y a su uso en métodos terapéuticos, por ejemplo, en la elaboración de medicamentos para su uso en la prevención o el tratamiento de diferentes tipos de cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano, incluido el uso en la prevención o el tratamiento del

10 cáncer.  
La presente invención también se refiere a derivados indólicos que reducen de forma selectiva la expresión del receptor estrogénico.

15 El receptor estrogénico alfa (ER $\alpha$ , ESR1, NR3A) y el receptor estrogénico beta (ER $\beta$ , ESR2, NR3b) son receptores de hormonas esteroides, los cuales son miembros de una gran familia de receptores nucleares. El ER $\alpha$  presenta una estructura similar a la de todos los receptores nucleares, está compuesto por seis dominios funcionales (que se denominan A-F) (Dahlman-Wright *et al.*, *Pharmacol. Rev.*, 2006, 58:773-781) y se clasifica como un factor de transcripción que depende del ligando debido a que, después de su asociación con el ligando específico, la hormona esteroide de sexo femenino 17 $\beta$  estradiol (E2), el complejo se une a secuencias genómicas, que se denominan elementos del receptor estrogénico (ERE), e interacciona con correguladores para modular la transcripción de los genes diana. El gen ER $\alpha$  se localiza en 6q25.1, codifica una proteína 595AA y se pueden producir múltiples isoformas debido a la existencia de sitios alternativos de inicio de la traducción y de corte y empalme. Además del dominio de unión al ADN (Dominio C) y el dominio de unión al ligando (Dominio E), el receptor contiene un dominio N-terminal (A/B), un dominio bisagra (D) que conecta los dominios C y E y una extensión C-terminal (dominio F). A pesar de que los dominios C y E de ER $\alpha$  y ER $\beta$  están bastante conservados (un 96% y un 55% de identidad de los aminoácidos, respectivamente), la conservación de los dominios A/B, D y F es escasa (una identidad de los aminoácidos inferior a un 30%). Ambos receptores participan en la regulación y el desarrollo del aparato reproductor femenino y además desempeñan funciones en el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y el metabolismo óseo. La acción genómica de los ER tiene lugar en el núcleo de la célula cuando el receptor se une a los ERE directamente (activación directa o vía clásica) o indirectamente (activación indirecta o vía no clásica). En ausencia de ligando, los ER se asocian con las proteínas de choque térmico, Hsp90 y Hsp70, y la maquinaria de chaperonas asociadas estabiliza el dominio de unión al ligando (LBD) de modo que lo hace accesible para el ligando. Cuando el ER se une al ligando, se disocia de las proteínas de choque térmico, lo cual provoca un cambio conformacional en el receptor que permite que tenga lugar la dimerización, la unión al ADN, la interacción con coactivadores o correpresores y la modulación de la expresión de genes diana. En la vía no clásica, AP-1 y Sp-1 son secuencias de ADN reguladoras alternativas utilizadas por ambas isoformas del receptor para modular la expresión génica. En este ejemplo, ER no interacciona directamente con el ADN, sino que interacciona a través de asociaciones con otros factores de transcripción unidos al ADN, p. ej., c-Jun o c-Fos (Kushner *et al.*, *Pure Applied Chemistry* 2003, 75:1757-1769). El mecanismo exacto mediante el cual ER afecta a la transcripción génica no se comprende bien, pero al parecer está mediado por numerosos factores nucleares que son agrupados por el receptor unido al ADN. El agrupamiento de los correguladores está mediado principalmente por dos superficies proteicas, AF2 y AF1, las cuales están localizadas en el dominio E y el dominio A/B, respectivamente. AF1 está regulada por factores de crecimiento y su actividad depende del entorno promotor y celular, mientras que la actividad de AF2 depende totalmente de la unión al ligando. Aunque los dos dominios pueden actuar de forma independiente, la actividad de transcripción máxima de ER se consigue mediante interacciones sinérgicas de los dos dominios (Tzukerman *et al.*, *Mol. Endocrinology*, 1994, 8:21-30). Aunque se considera que los ER son factores de transcripción, estos también pueden actuar a través de mecanismos no genómicos, como ponen de manifiesto los efectos rápidos del ER en tejidos tras la administración de E2 en una escala temporal que se considera demasiado rápida para una acción genómica. Todavía no se sabe con certeza si los receptores responsables de las acciones rápidas del estrógeno son los mismos ER nucleares o diferentes receptores de esteroides acoplados a la proteína G (Warner *et al.*, *Steroids* 2006 71:91-95), pero se ha identificado un número cada vez mayor de vías inducidas por E2, p. ej., la vía de MAPK/ERK, la activación de la óxido nítrico-sintasa endotelial y la vía de PI3K/Akt. Además de las vías que dependen del ligando, se ha demostrado que ER $\alpha$  presenta una actividad independiente del ligando a través de AF-1 que se ha asociado con la estimulación de MAPK mediante la señalización de factores de crecimiento, p. ej., el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La actividad de AF-1 depende de la fosforilación de Ser118 y un ejemplo de la comunicación cruzada entre ER y la señalización de factores de crecimiento es la fosforilación de Ser 118 por parte de MAPK como respuesta a factores de crecimiento tales como IGF-1 y EGF (Kato *et al.*, *Science*, 1995, 270:1491-1494).

60 Se ha demostrado que un gran número de compuestos estructuralmente diferentes se unen a ER. Algunos compuestos, tales como el ligando endógeno E2, actúan como agonistas del receptor, mientras que otros inhiben de forma competitiva la unión a E2 y actúan como antagonistas del receptor. Estos compuestos se pueden dividir en 2 clases dependiendo de sus efectos funcionales. Los moduladores de receptores estrogénicos selectivos

(SERM), tales como tamoxifeno, tienen la capacidad de actuar como agonistas y como antagonistas del receptor dependiendo del contexto promotor y celular, así como de la isoforma de ER diana. Por ejemplo, el tamoxifeno actúa como un antagonista en la mama, pero actúa como un agonista parcial en los huesos, el sistema cardiovascular y el útero. Al parecer todos los SERM actúan como antagonistas de AF2 y obtienen sus características de agonistas parciales a través de AF1. Un segundo grupo, del cual fulvestrant es un ejemplo, se clasifica como antagonistas totales y estos son capaces de bloquear la actividad del estrógeno a través de la inhibición completa de los dominios AF1 y AF2 mediante la inducción de un único cambio de la conformación en el dominio de unión al ligando (LBD) para la unión del compuesto, lo cual da como resultado la supresión completa de la interacción entre la hélice 12 y el resto del LBD, lo cual bloquea el agrupamiento de los cofactores (Wakeling *et al.*, *Cancer Res.*, 1991, 51:3867-3873; Pike *et al.*, *Structure*, 2001, 9:145-153).

Los niveles intracelulares de ER $\alpha$  se reducen en presencia de E2 mediante la vía de ubiquitina/proteosoma (Ub/26S). La poliubiquitinilación de ER $\alpha$  unido al ligando está catalizada por al menos tres enzimas; la ubiquitina activada por la enzima E1 activadora de la ubiquitina se conjuga mediante E2 con residuos de lisina a través de un enlace isopeptídico realizado por la ubiquitina-ligasa E3 y a continuación el ER $\alpha$  poliubiquitinilado se dirige al proteosoma para que se produzca su degradación. Aunque la regulación de la transcripción que depende de ER y la degradación de ER mediada por el proteosoma están conectadas (Lonard *et al.*, *Mol. Cell*, 2000 5:939-948), la transcripción en sí no es necesaria para la degradación de ER $\alpha$  y el acoplamiento del complejo de iniciación de la transcripción es suficiente para dirigir ER $\alpha$  hacia su degradación proteosómica nuclear. Se cree que este proceso de degradación inducido por E2 es necesario para su capacidad de activar rápidamente la transcripción como respuesta a requisitos de proliferación, diferenciación y metabolismo celular (Stenoien *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 2001, 21:4404-4412). Fulvestrant también se ha clasificado como un compuesto que reduce la expresión del receptor estrogénico de forma selectiva (SERD) y pertenece a un subgrupo de antagonistas que también pueden inducir una reducción rápida de la expresión de ER $\alpha$  mediante la vía proteosómica 26S. Por el contrario, un SERM tal como el tamoxifeno puede incrementar los niveles de ER $\alpha$ , aunque el efecto sobre la transcripción es similar al observado para SERD.

Aproximadamente un 70% de los diferentes tipos de cáncer de mama expresan ER y/o receptores de progesterona, lo cual implica que estas células tumorales dependen de la hormona para su desarrollo. Se cree que otros tipos de cáncer, tales como el endométrico y de ovario, también dependen de la señalización de ER $\alpha$  para su desarrollo. Las terapias para estos pacientes pueden inhibir la señalización de ER ya sea antagonizando la unión del ligando a ER, p. ej., el tamoxifeno, que se utiliza para tratar el cáncer de mama ER-positivo en estado inicial y avanzado en un contexto pre- y posmenstrual; antagonizando y reduciendo la expresión de ER $\alpha$ , p. ej., el fulvestrant, que se utiliza para tratar el cáncer de mama en mujeres en las cuales el cáncer ha evolucionado a pesar de la terapia con tamoxifeno o inhibidores de aromatasas; o bloqueando la síntesis de estrógenos, p. ej., los inhibidores de aromatasas, que se utilizan para tratar el cáncer de mama ER-positivo en estado inicial y avanzado. Aunque estas terapias han tenido un impacto enormemente positivo sobre el tratamiento del cáncer de mama, un número considerable de pacientes cuyos tumores expresan ER presentan resistencia de nuevo a terapias existentes de ER o desarrollan resistencia a estas terapias con el tiempo. Se han descrito varios mecanismos diferentes para explicar la resistencia a la terapia con tamoxifeno que ocurre por primera vez, la cual implica principalmente que el tamoxifeno pasa de actuar como un antagonista a actuar como un agonista, ya sea mediante la afinidad más baja de ciertos cofactores que se unen al complejo tamoxifeno-ER $\alpha$ , que está modificada debido a la sobreexpresión de estos factores, o mediante la formación de sitios secundarios que facilitan la interacción del complejo tamoxifeno-ER $\alpha$  con cofactores que normalmente no se unirían al complejo. Por consiguiente, la resistencia podría surgir como resultado del desarrollo en exceso de células que expresan cofactores específicos que dirigen la actividad del complejo tamoxifeno-ER $\alpha$ . También existe la posibilidad de que otras vías de señalización de factores de crecimiento activen directamente el receptor ER o coactivadores para que dirijan la proliferación celular independientemente de la señalización del ligando.

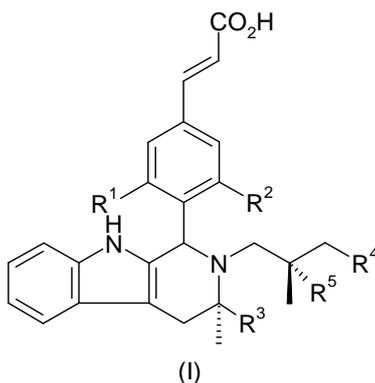
Más recientemente, se han identificado mutaciones en ESR1 como un posible mecanismo de resistencia en muestras de tumores procedentes de pacientes ER-positivos metastásicos y modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) con frecuencias comprendidas entre un 17 y un 25%. Estas mutaciones se encuentran predominantemente, pero no exclusivamente, en el dominio de unión al ligando y proporcionan proteínas funcionales mutadas; los ejemplos de cambios de aminoácidos incluyen Ser463Pro, Val543Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn y Asp538Gly, constituyendo los cambios en los aminoácidos 537 y 538 la mayoría de los cambios descritos actualmente. Estas mutaciones no se han detectado previamente en los genomas procedentes de muestras primarias de mama caracterizadas en la base de datos del Atlas del Genoma del Cáncer. De las 390 muestras primarias de cáncer de mama positivas para la expresión de ER, no se detectó ni una sola mutación en ESR1 (Red del Atlas del Genoma del Cáncer, 2012 *Nature* 490: 61-70). Se cree que las mutaciones del dominio de unión al ligando se han desarrollado como una respuesta de resistencia a las terapias endocrinas de inhibidores de aromatasas, ya que estos receptores mutados presentan una actividad de transcripción basal en ausencia de estradiol. La estructura cristalina de ER, mutado en los aminoácidos 537 y 538, mostró que ambos mutantes favorecían la conformación agonista de ER mediante el desplazamiento de la posición de la hélice 12 para permitir el agrupamiento de los coactivadores y mimetizar de este modo el ER natural activado por agonistas. Los datos publicados han demostrado que las terapias endocrinas, tales como tamoxifeno y fulvestrant, se pueden unir a un ER mutado y seguir inhibiendo la activación de la transcripción en cierto grado y

que fulvestrant es capaz de degradar Try537Ser pero pueden ser necesarias dosis más elevadas para la inhibición total del receptor (Toy *et al.*, *Nat. Genetics* 2013, 45: 1439-1445; Robinson *et al.*, *Nat. Genetics* 2013, 45: 1446-1451; Li, S. *et al.* *Cell Rep.* 4, 1116-1130 (2013). Por consiguiente, es posible que ciertos compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de estos, sean capaces de reducir la expresión de un ER mutado y antagonizarlo, aunque en este punto no se sabe si las mutaciones en ESR1 están asociadas con un resultado clínico modificado.

El documento WO 2005/070930 también describe compuestos útiles para tratar el cáncer. Independientemente de qué mecanismo de resistencia o combinación de mecanismos tenga lugar, muchos se siguen basando en actividades que dependen de ER y en el hecho de que la eliminación del receptor mediante un mecanismo SERD ofrece la mejor manera de eliminar el receptor ER $\alpha$  de la célula. Actualmente, fulvestrant es el único SERD aprobado para uso clínico, incluso a pesar de que sus propiedades mecanísticas y las propiedades farmacológicas del fármaco han limitado su eficacia, debido a la limitación actual de una dosis mensual de 500 mg, la cual proporciona una regeneración del receptor de un 50% en muestras de pacientes en comparación con la reducción completa de la expresión del receptor observada en experimentos de líneas celulares de mama *in vitro* (Wardell *et al.*, *Biochem. Pharm.*, 2011, 82:122-130). Por lo tanto, se necesitan agentes nuevos que tengan ER como diana y que posean las propiedades farmacéuticas y el mecanismo SERD necesarios para proporcionar un mayor beneficio en el contexto de la resistencia adquirida y metastásica en un estado inicial.

Se ha descubierto que los compuestos de la invención poseen una actividad antitumoral potente y son útiles para inhibir la proliferación celular incontrolada que se produce en la enfermedad maligna. Los compuestos de la invención proporcionan un efecto antitumoral actuando como SERD, como mínimo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este



donde:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno independientemente H o F;

R<sup>3</sup> es H o metilo; y

o bien:

a) R<sup>4</sup> es H y R<sup>5</sup> es F; o

b) R<sup>4</sup> es F y R<sup>5</sup> es H.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) como se ha definido anteriormente.

Los compuestos de Fórmula (I) tienen uno, dos o tres centros quirales y la invención engloba las formas quirales puras o mezclas de estas en cualquier proporción. La síntesis de formas ópticamente activas se puede llevar a cabo mediante técnicas estándar de química orgánica muy conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante la síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos o mediante la resolución de una forma racémica. De manera similar, la actividad mencionada anteriormente se puede evaluar utilizando las técnicas de laboratorio estándar.

Un enantiómero o diastereoisómero particular de un compuesto descrito en la presente puede ser más activo que otros enantiómeros o diastereoisómeros del mismo compuesto.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que es un único enantiómero con un exceso enantiomérico (% ee)  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$ . Convenientemente, el único enantiómero está presente con un exceso enantiomérico (% ee)  $\geq 99\%$ .

5

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), el cual es un único enantiómero con un exceso enantiomérico (% ee)  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$

10

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Convenientemente, el único enantiómero está presente con un exceso enantiomérico (% ee)  $\geq 99\%$ .

15

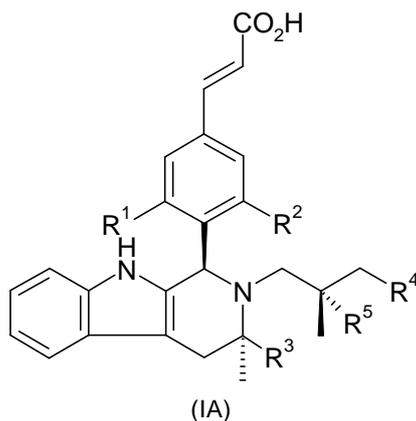
De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que es un único diastereoisómero con un exceso diastereomérico (%de)  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$ . Convenientemente, el único diastereoisómero está presente con un exceso diastereomérico (%de)  $\geq 99\%$ .

20

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de Fórmula (I) que es un único diastereoisómero con un exceso diastereomérico (%de)  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$  o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Convenientemente, el único diastereoisómero está presente con un exceso diastereomérico (%de)  $\geq 99\%$ .

25

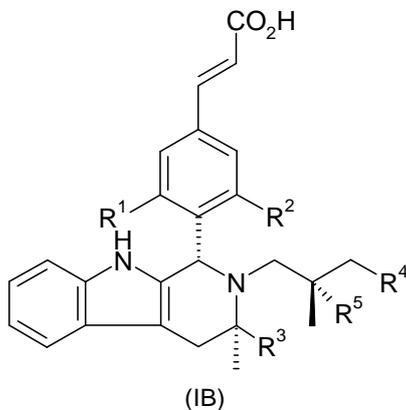
En un aspecto particular, el compuesto de Fórmula (I) es un compuesto de Fórmula (IA):



(IA)

30

En otro aspecto, el compuesto de Fórmula (I) es un compuesto de Fórmula (IB):

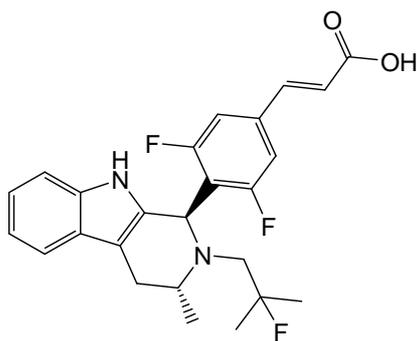


(IB)

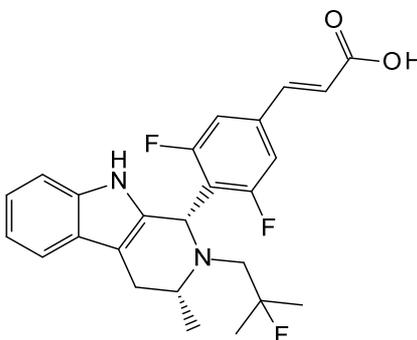
35

Se debe sobreentender que la referencia en la presente a los compuestos de Fórmula (I) hace referencia a los compuestos de Fórmula (IA) y/o (IB) a menos que se indique de otro modo.

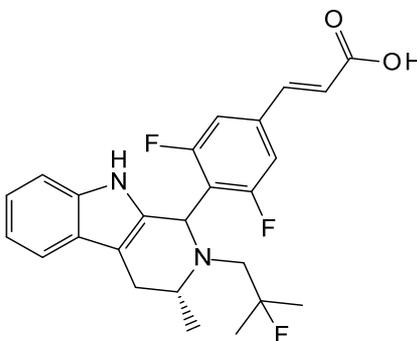
Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1, ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico es un ejemplo de un compuesto de Fórmula (IA).



5 Su isómero, el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*S*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilico, es un ejemplo de un compuesto de Fórmula (IB).



10 Estos dos isómeros son ejemplos del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilico, el cual es un ejemplo de un compuesto de Fórmula (I).



15 Algunos compuestos de Fórmula (I) pueden ser cristalinos y pueden tener más de una forma cristalina. Se debe sobrentender que la presente invención abarca cualquier forma cristalina o amorfa, o mezclas de estas, que posea propiedades útiles para la actividad de SERD; en la técnica se conoce bien cómo determinar la eficacia de una forma cristalina o amorfa para la actividad de SERD mediante las pruebas estándar que se describen posteriormente en la presente.

20 Es de conocimiento general que los materiales cristalinos se pueden analizar utilizando técnicas convencionales tales como el análisis por difracción de rayos X en polvo (en lo sucesivo en la presente DRXP), la calorimetría diferencial de barrido (en lo sucesivo en la presente CDB), el análisis termogravimétrico (en lo sucesivo en la presente ATG), la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia difusa (DRIFT), la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) o la espectroscopía de resonancia magnética nuclear en solución y/o estado sólido. El contenido de agua de dichos materiales cristalinos se puede determinar mediante el análisis de  
25 Karl Fischer.

A modo de ejemplo, el compuesto del Ejemplo 7 exhibe cristalinidad y se ha identificado una forma cristalina.

30 Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención es la Forma A del ácido (*E*)-3-(4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilico (Ejemplo 7).

- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7, que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.5^\circ$ .
- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7, que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 10.8^\circ$ .
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7, que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.5$  y  $10.8^\circ$ .
- 15 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7, que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.5, 4.8, 6.1, 7.9, 9.9, 10.8, 13.4, 14.0, 14.3$  y  $18.5^\circ$ .
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7, que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura 1.
- 20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7 que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.5^\circ \pm 0.2^\circ 2\text{-theta}$ .
- 25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7 que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 10.8^\circ \pm 0.2^\circ 2\text{-theta}$ .
- 30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7 que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.5$  y  $10.8^\circ \pm 0.2^\circ 2\text{-theta}$ .
- 35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma A del Ejemplo 7 que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.5, 4.8, 6.1, 7.9, 9.9, 10.8, 13.4, 14.0, 14.3$  y  $18.5 \pm 0.2^\circ 2\text{-theta}$ .
- Además, el Ejemplo 1 también presenta cristalinidad.
- 40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 8.4^\circ$ .
- 45 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 10.9^\circ$ .
- 50 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 8.4^\circ$  y  $10.9^\circ$ .
- 55 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 8.4, 10.9, 18.3, 24.0$  y  $14.0^\circ$ .
- 60 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 8.4, 10.9, 18.3, 24.0, 14.0, 19.0, 14.4, 13.0, 15.3, 20.6^\circ$ .
- 65 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que

presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura 2.

5 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a  $2\text{-theta} = 8.4^\circ \pm 0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos un pico específico a  $2\text{-theta} = 10.9^\circ \pm 0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .

15 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con al menos dos picos específicos a  $2\text{-theta} = 8.4^\circ$  y  $10.9^\circ$  donde dichos valores pueden ser  $\pm 0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .

20 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una forma cristalina, la Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 8.4, 10.9, 18.3, 24.0$  y  $14.0^\circ$  donde dichos valores pueden ser  $\pm 0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .

25 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico que presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos específicos a  $2\text{-theta} = 8.4, 10.9, 18.3, 24.0, 14.0, 19.0, 14.4, 13.0, 15.3, 20.6^\circ$  donde dichos valores pueden ser  $\pm 0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .

30 Cuando se menciona que la presente invención se refiere a una forma cristalina de la Forma B del Ejemplo 1, el grado de cristalinidad es convenientemente superior a aproximadamente un 60%, más convenientemente superior a aproximadamente un 80%, preferentemente superior a aproximadamente un 90% y más preferentemente superior a aproximadamente un 95%. De la forma más preferida, el grado de cristalinidad es superior a aproximadamente un 98%.

35 Además, cuando se menciona que la presente invención se refiere a una forma cristalina de la Forma B del Ejemplo 1, preferentemente el material está sustancialmente exento de otras formas cristalinas o de material amorfo. La expresión "sustancialmente exento" se refiere convenientemente a más de aproximadamente un 60%, más convenientemente a más de aproximadamente un 80%, preferentemente a más de aproximadamente un 90%, más preferentemente a más de aproximadamente un 95% y, de la forma más preferida, a más de aproximadamente un 98% de un único polimorfo.

40 Se sobreentenderá que los valores  $2\text{-theta}$  de los patrones de difracción de rayos X en polvo pueden variar ligeramente de un instrumento a otro o de una muestra a otra y, por lo tanto, los valores indicados no se deben interpretar como absolutos.

45 Existe constancia de que se puede obtener un patrón de difracción de rayos X en polvo con uno o más errores de medición dependiendo de las condiciones de medición (tales como el equipo o el instrumento empleado). En particular, es de conocimiento general que las intensidades en un patrón de difracción de rayos X en polvo pueden fluctuar dependiendo de las condiciones de medición. Por lo tanto, se debe sobreentender que las formas cristalinas de la presente invención descritas anteriormente, a menos que se indique de otra forma, no se limitan a los cristales que proporcionan patrones de difracción de rayos X en polvo idénticos a los patrones de difracción de rayos X en polvo que se muestran en las figuras relevantes y cualesquiera cristales que proporcionen patrones de difracción de rayos X en polvo sustancialmente iguales a los que se muestran en estas figuras se encontrarán dentro del alcance de la presente invención. Un experto en la técnica de la difracción de rayos X en polvo será capaz de juzgar la existencia de una identidad sustancial entre patrones de difracción de rayos X en polvo.

60 Los expertos en la técnica de la difracción de rayos X en polvo también se darán cuenta de que la intensidad relativa de los picos se puede ver afectada, por ejemplo, por granos con un tamaño superior a 30 micras y relaciones entre las dimensiones no unitarias, lo cual puede afectar al análisis de las muestras. El experto también se dará cuenta de que la posición de las reflexiones se puede ver afectada por la altura exacta a la cual se coloca la muestra en el difractómetro y la calibración del cero del difractómetro. Puede que también tenga un pequeño efecto la planicidad de la superficie de la muestra. Por consiguiente, los datos de los patrones de difracción presentados no se deben considerar como valores absolutos (remítase a Jenkins, R y Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons 1996; Bunn, C.W. (1948), *Chemical Crystallography*, Clarendon Press, Londres; Klug, H. P. y Alexander, L. E. (1974), *X-Ray Diffraction Procedures*).

En general, un error de medición de un ángulo de difracción en un difractograma de rayos X en polvo es de aproximadamente  $\pm 0.2^\circ 2\text{-theta}$  y tal grado de error de medición se debería tener en cuenta al considerar los datos de difracción de rayos X en polvo. Además, se debe sobreentender que las intensidades podrían fluctuar dependiendo de las condiciones experimentales y la preparación de la muestra (orientación preferida).

Los compuestos particulares de la invención son cada uno de los Ejemplos, cada uno de los cuales proporciona otro aspecto independiente de la invención. Otros compuestos particulares de la invención son una o más sales farmacéuticamente aceptables de cada uno de los Ejemplos, cada una de las cuales proporciona un aspecto independiente adicional de la invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), que se puede obtener siguiendo cualquiera de los Ejemplos descritos en la presente.

Una característica adicional es cualquiera de los alcances definidos en la presente con la condición de que se renuncie individualmente a Ejemplos específicos tales como el Ejemplo 1, 2, 3, etc.

Los expertos en la técnica apreciarán que ciertos compuestos de Fórmula (I) contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente y, por lo tanto, pueden existir y aislarse en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos compuestos de Fórmula (I) pueden exhibir polimorfismo. Se debe sobreentender que la presente invención abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de estas, que posea propiedades útiles como SERD, siendo la preparación de formas ópticamente activas muy conocida en la técnica (por ejemplo, por resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral, mediante resolución enzimática, mediante biotransformación o mediante separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria quiral), así como también la determinación de la eficacia como SERD mediante las pruebas estándar que se describen posteriormente en la presente.

Se debe sobreentender que ciertos compuestos de Fórmula (I) definidos anteriormente pueden presentar el fenómeno de la tautomería. Se debe sobreentender que la presente invención incluye en su definición cualquiera de estas formas tautoméricas, o una mezcla de estas, que posea actividad de SERD y no está limitada meramente a cualquier forma tautomérica utilizada en los dibujos de las fórmulas o nombrada en los Ejemplos. En general, tan solo una de cualquiera de estas formas tautoméricas se nombra en los Ejemplos que se muestran posteriormente en la presente o se expone en cualquiera de los dibujos de las fórmulas relevantes que se muestran posteriormente en la presente.

Se pretende que la presente invención incluya todos los isótopos de los átomos que aparecen en los presentes compuestos. Se sobreentenderá que los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos de carbono incluyen  $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$ . En el Ejemplo 10 se describe una versión deuterada del Ejemplo 1.

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, una sal de un metal alcalino o alcalinotérreo tal como una sal de sodio, calcio o magnesio, o una sal de amonio, o una sal con una base orgánica tal como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina o tris(2-hidroxiethyl)amina. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de un compuesto de Fórmula (I) pueden ser sales de otros metales, tales como potasio, zinc u otros cationes metálicos de este tipo conocidos en la técnica. En un aspecto de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I) es una sal con un catión metálico, una sal de amonio o una sal con una base orgánica.

Otra sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, una sal formada dentro del cuerpo humano o animal después de la administración de un compuesto de Fórmula (I).

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de Fórmula (I) puede ser, por ejemplo, una sal de adición de ácido de un compuesto de Fórmula (I), por ejemplo, una sal de adición de ácido con un ácido orgánico o inorgánico fuerte tal como el ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico o trifluoroacético. Otra posible sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de Fórmula (I) también puede ser como la que se describe posteriormente en el Ejemplo 1.

En otro aspecto de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I) es una sal de adición de ácido.

Los experimentos realizados para investigar la formación de sales de los compuestos de Fórmula (I) examinaron el potencial del Ejemplo 1 (ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico) para formar sales cristalinas. Se probaron los ácidos y las bases siguientes:

5 ácido acético, ácido adípico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido D,L-láctico, ácido etanodisulfónico, ácido etanosulfónico, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido L-tartárico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido napadisílico, ácido fosfórico, sacarina, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido toluenosulfónico, acetato de calcio, dietilamina, etanolamina, etilendiamina, hidroxietilpirrolidina, acetato de magnesio, meglumina, piperazina, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, *t*-butilamina, trietanolamina, tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y *N,N*-dietiletanolamina.

10 De los ácidos y las bases anteriores, no siempre se pudieron obtener sales sólidas aislables o no siempre se pudieron obtener en forma cristalina en las condiciones experimentales empleadas. Las sales preferidas del Ejemplo 1 incluyen las que se pueden aislar en forma cristalina, por ejemplo, la sal del ácido bencenosulfónico (sal de tipo besilato), la sal del ácido succínico (sal de tipo succinato) y la sal del ácido maleico (sal de tipo maleato).

15 En un aspecto, las sales adecuadas del Ejemplo 1 pueden incluir el besilato, succinato y maleato. En otro aspecto, una sal adecuada del Ejemplo 1 puede ser la sal de tipo maleato, la cual se describe en el Ejemplo 11.

20 Además, se debe sobreentender que un cocrystal farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) también constituye un aspecto de la presente invención. Para que no haya lugar a dudas, el término "cocrystal" se refiere a un sistema de componentes múltiples en el cual existe una molécula o moléculas de API (principio farmacéutico activo) hospedantes y una molécula o moléculas huésped (o coformadoras). En un cocrystal, tanto la molécula de API como la molécula huésped (o coformadora) existen como un sólido a temperatura ambiente cuando están solas en su forma pura (para distinguir la forma cocrystalina de los solvatos o hidratos). Las sales, en las cuales tiene lugar un intercambio de protones significativo o completo entre la molécula de API y la molécula huésped, quedan excluidas de esta definición particular. En un cocrystal, la molécula de API y la molécula coformadora interaccionan mediante puentes de hidrógeno y posiblemente otras interacciones no covalentes. Los coformadores farmacéuticamente aceptables incluyen moléculas neutras tales como nicotinamida, resorcinol y xilenoles, así como también moléculas ionizables tales como el ácido oxálico, ácido 3,5-dihidroxibenzoico y la isoquinolina (el grado de intercambio de protones determinará si se forma una sal o un cocrystal). Cabe destacar que un cocrystal puede formar, de por sí, solvatos, incluidos los hidratos.

30 Además, se debe sobreentender que un solvato farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) también constituye un aspecto de la presente invención. Un solvato farmacéuticamente aceptable adecuado es, por ejemplo, un hidrato tal como un hemihidrato, un monohidrato, un dihidrato o un trihidrato o una cantidad alternativa de estos.

35 Además, se debe sobreentender que un profármaco farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) también constituye un aspecto de la presente invención. Por consiguiente, los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de un profármaco, que es un compuesto que se descompone en el cuerpo humano o animal para liberar un compuesto de la invención. Se puede emplear un profármaco para alterar las propiedades físicas y/o las propiedades farmacocinéticas de un compuesto de la invención. Se puede formar un profármaco cuando el compuesto de la invención contiene un grupo o sustituyente adecuado al cual se pueda unir un grupo que modifique las propiedades. Los ejemplos de profármacos incluyen los derivados de tipo éster que se puedan escindir *in vivo* y que se puedan formar en un grupo carboxi en un compuesto de Fórmula (I).

45 Por consiguiente, la presente invención incluye los compuestos de Fórmula (I) según se han definido anteriormente en la presente cuando se pueden obtener mediante síntesis orgánica y cuando se pueden obtener en el cuerpo humano o animal mediante la escisión de un profármaco de estos. Por consiguiente, la presente invención incluye los compuestos de Fórmula (I) que se producen mediante métodos de síntesis orgánica y también los compuestos que se producen en el cuerpo humano o animal al metabolizar un compuesto precursor, es decir, un compuesto de Fórmula (I) puede ser un compuesto producido sintéticamente o un compuesto producido metabólicamente.

50 Un profármaco farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) es un profármaco que, según un criterio médico razonable, es adecuado para la administración al cuerpo humano o animal sin que presente actividades farmacológicas indeseables ni una toxicidad indebida.

Se han descrito varias formas de profármacos, por ejemplo, en los siguientes documentos:

- 60 a) *Methods in Enzymology*, Vol. 42, págs. 309-396, editado por K. Widder *et al.* (Academic Press, 1985);
- b) *Design of Pro-drugs*, editado por H. Bundgaard (Elsevier, 1985);
- 65 c) *A Textbook of Drug Design and Development*, editado por Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Capítulo 5 "Design and Application of Prodrugs", de H. Bundgaard, págs. 113-191 (1991);

- d) H. Bundgaard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **8**, 1-38 (1992);
- e) H. Bundgaard *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **77**, 285 (1988);
- 5 f) N. Kakeya *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 692 (1984);
- g) T. Higuchi y V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems", Serie de congresos de la A.C.S., Volumen 14; y
- 10 h) E. Roche (editor), "Bioreversible Carriers in Drug Design", Pergamon Press, 1987.

Un profármaco farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) que posee un grupo carboxi es, por ejemplo, un éster de este que se pueda escindir *in vivo*. Un éster que se pueda escindir *in vivo* de un compuesto de Fórmula (I) que contiene un grupo carboxi es, por ejemplo, un éster farmacéuticamente aceptable que se escinde en el cuerpo humano o animal para producir el ácido original. Los ésteres farmacéuticamente aceptables adecuados para carboxi incluyen ésteres de alquilo (C1-6) tales como ésteres de metilo, etilo y *tert*-butilo, ésteres de alcoxi(C1-6)metilo tales como ésteres de metoximetilo, ésteres de alcanoiloxi(C1-6)metilo tales como ésteres de pivaloiloximetilo, ésteres de 3-ftalidilo, ésteres de

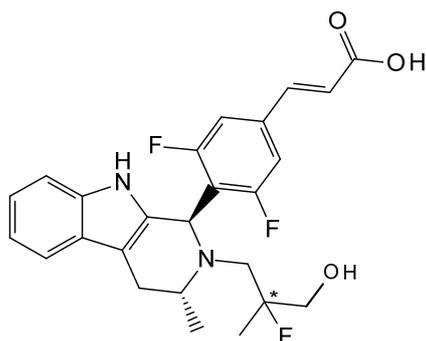
20 ésteres de ciclopentilcarboniloximetilo y 1-ciclohexilcarboniloxietilo,

ésteres de 2-oxo-1,3-dioxolenilmetilo tales como ésteres de 5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-ilmetilo y ésteres de

25 Un profármaco farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) que tiene un grupo carboxi es, por ejemplo, una amida que se pueda escindir *in vivo* tal como una *N*-(alquilC<sub>1-6</sub>)amida y una *N,N*-di(alquil C<sub>1-6</sub>)amida tal como *N*-metil-, *N*-etil-, *N*-propil-, *N,N*-dimetil-, *N*-etil-*N*-metil- o *N,N*-dietilamida.

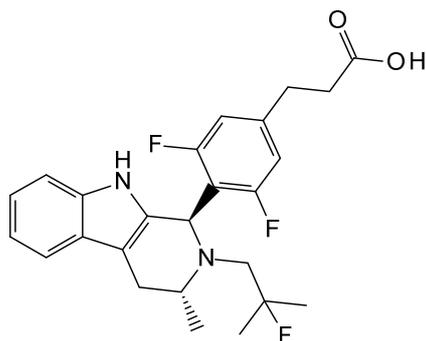
30 Los efectos *in vivo* de un compuesto de Fórmula (I) pueden ser ejercidos en parte por uno o más metabolitos que se forman en el cuerpo humano o animal después de la administración de un compuesto de Fórmula (I). Según se ha mencionado anteriormente en la presente, los efectos *in vivo* de un compuesto de Fórmula (I) también pueden ser ejercidos al metabolizar un compuesto precursor (un profármaco).

35 Se han identificado dos metabolitos isoméricos activos del Ejemplo 1 a partir de sistemas humanos *in vitro*, como se muestra a continuación (donde los isómeros son diastereoméricos como resultado de que existen ambas configuraciones en el carbono marcado con un \*) y la síntesis de ambos isómeros se expone en los Ejemplos 14A y B de la presente:



40

Además, se cree que el siguiente compuesto es un metabolito activo en algunas especies tales como el ratón:



Estos metabolitos activos constituyen aspectos independientes adicionales de la invención.

5 Para que no haya lugar a dudas, se debe sobrentender que cuando en esta memoria descriptiva se califica a un grupo como “definido anteriormente en la presente” o “anteriormente definido en la presente”, dicho grupo abarca la primera y más amplia definición que se haya dado, así como todas y cada una de las definiciones particulares para ese grupo.

10 Los compuestos novedosos particulares de la invención incluyen, por ejemplo, compuestos de Fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de estos, donde, a menos que se indique de otra forma, cada uno de los grupos R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> tiene cualquiera de los significados definidos anteriormente en la presente o en las siguientes afirmaciones:

15 En un aspecto, R<sup>1</sup> es hidrógeno. En otro aspecto, R<sup>1</sup> es fluoro.

En un aspecto, R<sup>2</sup> es hidrógeno. En otro aspecto, R<sup>2</sup> es fluoro.

20 En un aspecto, tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> son hidrógeno. En otro aspecto, tanto R<sup>1</sup> como R<sup>2</sup> son fluoro. En otro aspecto, R<sup>1</sup> es hidrógeno y R<sup>2</sup> es fluoro.

En un aspecto, R<sup>3</sup> es hidrógeno. En otro aspecto, R<sup>3</sup> es metilo.

25 En un aspecto, R<sup>4</sup> es hidrógeno y R<sup>5</sup> es fluoro. En otro aspecto, R<sup>5</sup> es hidrógeno y R<sup>4</sup> es fluoro.

Algunos compuestos particulares de la invención son, por ejemplo, los compuestos de Fórmula (I) que se describen en los Ejemplos que se exponen posteriormente en la presente.

30 Por ejemplo, un compuesto particular de la invención es un compuesto de Fórmula (I) seleccionado entre cualquiera de los siguientes:

ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

35 ácido (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

40 ácido (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

45 ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (E)-3-(4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

50 ácido (E)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (E)-3-(3-fluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

Otro compuesto particular de la invención es un compuesto de Fórmula (I) seleccionado entre cualquiera de los siguientes:

ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4(1*R*)-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4(1*R*)-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(4(1*R*)-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(4(1*R*)-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

ácido (*E*)-3-(3-fluoro-4(1*R*)-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico; y

ácido (*E*)-3-[4-[(1*R*,3*R*)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il]-3,5-difluorofenil]prop-2-enoico;

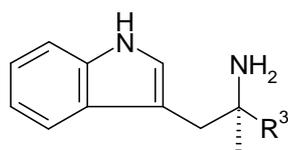
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

Una sal farmacéuticamente aceptable particular de la invención es el maleato de (1*R*,3*R*)-1-{4-[(*E*)-2-carboxietenil]-2,6-difluorofenil}-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-beta-carbolin-2-ilo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Un proceso adecuado se ilustra mediante las siguientes variantes representativas del proceso en las que, a menos que se indique de otra forma, R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup> tienen cualquiera de los significados definidos anteriormente en la presente. Los materiales de partida necesarios se pueden obtener mediante procedimientos estándar de química orgánica. La preparación de dichos materiales de partida se describe junto con las siguientes variantes representativas del proceso y en los Ejemplos adjuntos. De forma alternativa, los materiales de partida necesarios se pueden obtener mediante procedimientos análogos a los ilustrados, los cuales se encuentran dentro de las competencias de un químico orgánico.

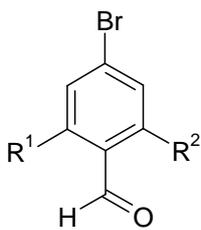
Los compuestos de fórmula (I) se preparan convenientemente mediante la hidrólisis de un derivado de tipo éster de fórmula (II), donde R<sup>6</sup> es un alquilo (C1-6) tal como metilo. La hidrólisis se lleva a cabo convenientemente en presencia de una base, por ejemplo, utilizando hidróxido de sodio en un disolvente adecuado (tal como MeOH y THF acuoso (u otro alcohol similar), o tal como un alcohol acuoso, por ejemplo, isopropanol acuoso) y a una temperatura adecuada, convenientemente temperatura ambiente.





(VII)

5 Los compuestos de fórmula (IV) se pueden preparar mediante la reacción de un compuesto de fórmula (VIII) con un éster de tipo acrilato de alquilo (tal como acrilato de metilo donde R<sup>6</sup> es metilo) en las condiciones conocidas en la técnica para una reacción de Heck, es decir, en presencia de una arilfosfina (p. ej., tri-*o*-tolilfosfina), un catalizador de paladio (tal como acetato de paladio (II)) y una base (tal como trietilamina) en un disolvente adecuado (tal como DMA) y a una temperatura adecuada (p. ej., 80 °C).



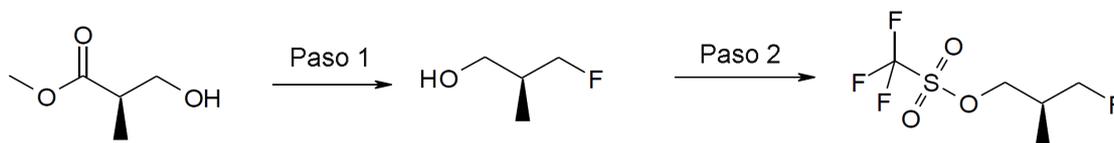
(VIII)

10

15 Los compuestos de fórmula (V) se pueden preparar mediante la reacción de un compuesto de fórmula (VII) con un compuesto de fórmula (IV) utilizando unas condiciones similares a las descritas para la reacción anterior de los compuestos de fórmulas (III) y (IV).

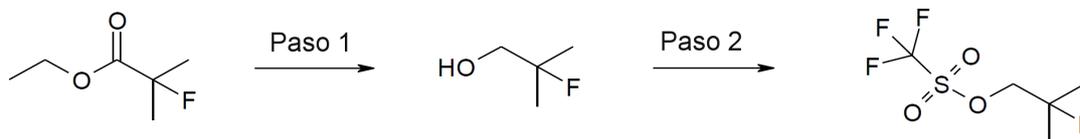
20 Los compuestos de fórmula (VI), donde LG es triflato, se pueden preparar como se muestra a continuación en los Esquemas 1 y 2. Otros compuestos de fórmula (VI), donde LG no sea triflato, se pueden preparar mediante métodos similares conocidos en la técnica.

20

Esquema 1

25 Paso 1: Agente fluorante, p. ej., *N,N*-dietil-1,1,2,3,3,3-hexafluoropropan-1-amina/DCM/temp. amb., a continuación agente reductor, p. ej., hidruro de aluminio y litio/THF/temp. amb.

Paso 2: Anhídrido trifluorometanosulfónico/base, p. ej., 2,6-lutidina/DCM/0 °C

30 Esquema 2

35 Paso 1: Agente reductor, p. ej., hidruro de aluminio y litio/éter/0 °C

Paso 2: Anhídrido trifluorometanosulfónico/base, p. ej., 2,6-lutidina/DCM/-10 °C

40 Los compuestos de fórmula (I) son quirales. El experto sobreentenderá que se pueden utilizar reacciones estereoselectivas para obtener los isómeros deseados. Como alternativa, la estereoquímica se puede ajustar utilizando medios adecuados, por ejemplo, epimerizando isómeros *cis* para obtener isómeros *trans* mediante la acidificación de un intermedio con el grupo amino protegido, según se ilustra en el Ejemplo 4 de la presente (y se describe, por ejemplo, en *J. Org. Chem.* 2009, 74, 2771–2779).

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I) que comprende la hidrólisis de un compuesto de fórmula (II), convenientemente en presencia de base.

5 Se debe sobreentender que también son posibles otras permutaciones de los pasos del proceso en las variantes del proceso descritas anteriormente.

Se debe sobreentender que cualquier compuesto de Fórmula (I) obtenido mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente en la presente se puede convertir en otro compuesto de Fórmula (I) si es necesario.

10 Cuando se requiere una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I), esta se puede obtener, por ejemplo, mediante la reacción de dicho compuesto con una base adecuada.

15 Cuando se requiere un profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I), este se puede obtener utilizando un procedimiento convencional. Por ejemplo, un éster que se pueda escindir *in vivo* de un compuesto de Fórmula (I) se puede obtener, por ejemplo, mediante la reacción de un compuesto de Fórmula (I) que contiene un grupo carboxi con un alcohol farmacéuticamente aceptable. Anteriormente en la presente se ha proporcionado información adicional acerca de los profármacos.

20 También se apreciará que, en algunas de las reacciones mencionadas previamente en la presente, puede ser necesario o deseable proteger cualesquiera grupos sensibles en los compuestos. Los expertos en la técnica estarán familiarizados tanto con los casos en los que se necesita protección o en los que esta es deseable como con los métodos adecuados para dicha protección. Se pueden emplear los grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica estándar (para consultar ejemplos de estos, remítase a T.W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1991). Así pues, si los reactivos incluyen grupos tales como amino, carboxi o hidroxilo, puede ser deseable proteger el grupo en algunas de las reacciones mencionadas en la presente.

30 Un grupo protector adecuado para un grupo amino o alquilamino es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo, un grupo alcanilo tal como acetilo, un grupo alcoxycarbonilo, por ejemplo, un grupo metoxycarbonilo, etoxycarbonilo o *t*-butoxycarbonilo, un grupo arilmetoxycarbonilo, por ejemplo, benciloxycarbonilo, o un grupo aroilo, por ejemplo, benzoilo. Las condiciones de desprotección para los grupos protectores precedentes variarán necesariamente con la elección del grupo protector. Así pues, por ejemplo, un grupo acilo, tal como un grupo alcanilo o alcoxycarbonilo, o un grupo aroilo pueden eliminarse, por ejemplo, por hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de un metal alcalino, por ejemplo, hidróxido de sodio o litio. Como alternativa, un grupo acilo, tal como un grupo *tert*-butoxycarbonilo, se puede eliminar, por ejemplo, por tratamiento con un ácido adecuado, tal como ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, o ácido trifluoroacético; y un grupo arilmetoxycarbonilo, tal como un grupo benciloxycarbonilo, se puede eliminar, por ejemplo, por hidrogenación con un catalizador tal como paladio sobre carbón, o por tratamiento con un ácido de Lewis, por ejemplo, tris(trifluoroacetato) de boro. Un grupo protector alternativo adecuado para un grupo amino primario es, por ejemplo, un grupo ftaloilo que puede eliminarse por tratamiento con una alquilamina, por ejemplo, dimetilaminopropilamina, o con hidrazina.

45 Un grupo protector adecuado para un grupo hidroxilo es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo, un grupo alcanilo tal como acetilo, un grupo aroilo, por ejemplo, benzoilo, o un grupo arilmetilo, por ejemplo, bencilo. Las condiciones para la desprotección de los grupos protectores precedentes variarán necesariamente con la elección del grupo protector. Así pues, por ejemplo, un grupo acilo tal como un grupo alcanilo o un grupo aroilo se puede eliminar, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de un metal alcalino, por ejemplo, hidróxido de sodio o litio. Como alternativa, un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo se puede eliminar, por ejemplo, por hidrogenación con un catalizador tal como paladio sobre carbón.

50 Un grupo protector adecuado para un grupo carboxi es, por ejemplo, un grupo esterificante, por ejemplo, un grupo metilo o etilo que se puede eliminar, por ejemplo, por hidrólisis con una base tal como hidróxido de sodio; o, por ejemplo, un grupo *t*-butilo que se puede eliminar, por ejemplo, por tratamiento con un ácido, por ejemplo, un ácido orgánico tal como ácido trifluoroacético; o, por ejemplo, un grupo bencilo que se puede eliminar, por ejemplo, por hidrogenación con un catalizador tal como paladio sobre carbón.

55 Los grupos protectores se pueden eliminar en cualquier etapa conveniente de la síntesis utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica química.

60 Ciertos intermedios (por ejemplo, los compuestos de Fórmulas II, III, IV, V, VI, VII y VIII, particularmente los compuestos de Fórmula II, III y/o V) definidos en la presente son novedosos y estos se proporcionan como una característica adicional de la invención.

#### Ensayos biológicos

65 Los siguientes ensayos se utilizaron para evaluar los efectos de los compuestos de la presente invención.

Ensayo de unión a ER $\alpha$ 

La capacidad de los compuestos para unirse al dominio de unión al ligando del receptor estrogénico alfa aislado (ER alfa-LBD (GST)) se evaluó en ensayos de competición utilizando como punto de evaluación la detección mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) LanthaScreen™. Para el punto de evaluación mediante TR-FRET LanthaScreen, se adquirieron de Invitrogen un fluoróforo adecuado (Fluormone ES2, código del producto: P2645) y el dominio de unión al ligando del receptor estrogénico alfa humano recombinante (código del producto: PV4543) y se utilizaron para medir la unión del compuesto. El principio del ensayo consiste en que se añade ER alfa-LBD (GST) a un ligando fluorescente para formar un complejo de receptor/fluoróforo. Se utiliza un anticuerpo anti-GST marcado con terbio (código del producto: PV3551) para marcar indirectamente el receptor mediante la unión a su etiqueta GST y la unión competitiva se detecta mediante la habilidad de los compuestos de prueba para desplazar el ligando fluorescente, lo cual provoca una pérdida de señal TR-FRET entre el anticuerpo Tb-anti-GST y el trazador. El ensayo se llevó a cabo como se indica a continuación y las adiciones de todos los reactivos se realizaron utilizando una estación de trabajo microfluidica Beckman Coulter BioRAPTR FRD:

1. Dispensar acústicamente 120 nL de compuesto de prueba en placas de ensayo negras de bajo volumen de 384 pocillos.
2. Preparar 1x ER alfa-LBD/anticuerpo Tb-antiGST en tampón de cribado ES2 e incubar durante 20 minutos.
3. Añadir 1x fluoróforo a la solución de ER alfa-LBD/anticuerpo Tb-antiGST antes de su uso.
4. Dispensar 12  $\mu$ L del reactivo 1x AR-LBD/anticuerpo Tb-anti-GST/fluoróforo en cada pocillo de la placa de ensayo.
5. Cubrir la placa de ensayo para proteger los reactivos de la luz y la evaporación e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
6. Excitar a 337 nm y medir la señal de emisión fluorescente de cada pocillo a 490 nm y 520 nm utilizando el BMG PheraSTAR.

Los compuestos se añadieron directamente desde una microplaca que era la fuente del compuesto, la cual contenía el compuesto diluido en serie (4 pocillos contenían el compuesto final con una concentración de 10 mM, 0.1 mM, 1  $\mu$ M y 10 nM, respectivamente), a una microplaca de ensayo utilizando un Labcyte Echo 550. El Echo 550 es un aparato para manipular líquidos que utiliza tecnología acústica para realizar transferencias directas de microplaca a microplaca de soluciones de compuesto en DMSO y el sistema se puede programar para transferir múltiples volúmenes pequeños en nL de compuesto desde los distintos pocillos de la placa fuente para proporcionar la dilución en serie deseada del compuesto en el ensayo, que después se vuelve a llenar para normalizar la concentración de DMSO en todo el rango de dilución. En total, se añaden 120 nL de compuesto más DMSO a cada pocillo y los compuestos se evalúan en un formato de respuesta a la concentración de 12 puntos en un rango de concentraciones finales del compuesto de 100, 29.17, 10.42, 2.083, 1, 0.292, 0.104, 0.02083, 0.01, 0.002917, 0.001042, 0.0001  $\mu$ M, respectivamente. Los datos de respuesta a la dosis de TR-FRET obtenidos con cada compuesto se exportaron a un paquete de software adecuado (tal como Origin o Genedata) para realizar el análisis de ajuste de la curva. La unión competitiva a ER alfa se expresó como un valor de CI<sub>50</sub>. Este se determinó calculando la concentración de compuesto necesaria para obtener una reducción de un 50% de la unión del compuesto trazador a ER alfa-LBD.

Ensayo de reducción de la expresión de ER en MCF-7

La capacidad de los compuestos para reducir la expresión del receptor estrogénico (ER) se evaluó en un ensayo de inmunofluorescencia basado en células utilizando la línea humana de células de mama con carcinoma ductal MCF-7. Se revivieron células MCF-7 directamente en un vial criogénico (aprox.  $5 \times 10^6$  células) en medio de ensayo (medio Eagle modificado de Dulbecco exento de rojo de fenol (DMEM) (Sigma D5921) que contenía L-Glutamina 2mM y se inyectaron de una vez con una jeringa células de suero bovino fetal tratadas con carbón/dextrano al 5% (v/v) utilizando una aguja estéril de calibre amplio de 18G x 1.5 pulgadas (1.2 x 40 mm) y se midió la densidad celular utilizando un contador Coulter (Beckman). Las células se diluyeron adicionalmente en medio de ensayo hasta una densidad de  $3.75 \times 10^4$  células por mL y se añadieron 40  $\mu$ L por pocillo a placas negras de fondo transparente de 384 pocillos tratadas con cultivo tisular (Costar, N.º 3712) utilizando un Thermo Scientific Matrix WellMate o Thermo Multidrop. Después de sembrar las células, las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> (incubadora con carrusel de Liconic). Los datos de la prueba se generaron utilizando el reformateador de compuestos LabCyte Echo® modelo 555, el cual forma parte de una celda de trabajo automatizada (celda de trabajo Echo 2 integrada). Se utilizaron soluciones patrón del compuesto 10 mM para los compuestos de prueba con el fin de generar una placa de dosificación del compuesto de 384 pocillos (Labcyte P-05525-CV1). Se dispensaron 40  $\mu$ L de cada una de las soluciones patrón de compuesto 10

mM en el primer pocillo del cuadrante y a continuación se realizaron diluciones en serie 1:100 en DMSO por pasos utilizando una unidad de manipulación de líquidos Hydra II (MATRIX UK) para obtener 40 µL del compuesto diluido en los pocillos 2 (0.1 mM), 3 (1 µM) y 4 (0.01 µM) del cuadrante, respectivamente. Para obtener una normalización del DMSO en todo el rango de dosis, se añadieron 40 µL de DMSO a los pocillos de la fila P en la placa que actúa como fuente. Para dosificar los pocillos de control, se añadieron 40 µL de DMSO a la fila O1 y se añadieron 40 µL de Faslodex® 100 µM en DMSO a la fila O3 en la placa que actúa como la fuente del compuesto. El Echo utiliza tecnología acústica para realizar transferencias directas de microplaca a microplaca de soluciones de compuesto en DMSO a placas de ensayo. El sistema se puede programar para transferir volúmenes de incluso 2.5 nL en múltiples incrementos entre microplacas y al hacerlo genera una dilución en serie del compuesto en la placa de ensayo que después se vuelve a llenar para normalizar la concentración de DMSO en todo el rango de dilución. Los compuestos se dispensaron en las placas de células con una placa que actuaba como la fuente del compuesto preparada como se ha descrito anteriormente, de este modo se produjo un rango de dosis de 3 µM a 3 pM por duplicado de 12 pt con diluciones con un factor de dilución de 3 y una dilución final con un factor de dilución de 10 utilizando la celda de trabajo Echo 2 integrada. Los pocillos del control de la señal máxima se dosificaron con DMSO para tener una concentración final de un 0.3% y los pocillos de control de la señal mínima se dosificaron con Faslodex® para obtener una concentración final de 100 nM, de la forma correspondiente. Las placas se incubaron adicionalmente durante 18-22 horas a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> y a continuación se fijaron mediante la adición de 20 µL de una solución de formaldehído al 11.1% (v/v) (en solución salina taponada con fosfato (PBS)) para obtener una concentración final de formaldehído de un 3.7% (v/v). Las células se fijaron a temperatura ambiente durante 20 min antes de lavarlas dos veces con 250 µL de PBS/Proclin (PBS con un conservante biocida) utilizando un instrumento para lavar placas de BioTek, a continuación se añadieron 40 µL de PBS/Proclin a todos los pocillos y las placas se conservaron a 4 °C. El método de fijación descrito anteriormente se llevó a cabo en la celda de trabajo Echo 2 integrada. Se realizó una inmunotinción utilizando una celda de trabajo AutoElisa automatizada. Se aspiró la solución de PBS/Proclin de todos los pocillos y las células se permeabilizaron con 40 µL de PBS que contenía un 0.5% de Tween™ 20 (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces en 250 µL de PBS/0.05% (v/v) de Tween 20 con Proclin (PBST con un conservante biocida) y a continuación se añadieron 20 µL de anticuerpo monoclonal de conejo para ERα (SP1) (ThermoFisher) 1:1000 en PBS/Tween™/3% (p/v) de albúmina de suero bovino. Las placas se incubaron durante toda la noche a 4 °C (incubadora con carrusel de Liconic) y a continuación se lavaron tres veces en 250 µL de PBS/0.05% (v/v) de Tween™ 20 con Proclin (PBST). A continuación, las placas se incubaron con 20 µL/pocillo de un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra AlexaFluor 594 o anti-IgG de conejo producido en cabra AlexaFluor 488 (Molecular Probes) con Hoechst en una proporción de 1:5000 en PBS/Tween™/3% (p/v) de albúmina de suero bovino durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron tres veces en 250 µL de PBS/0.05% (v/v) de Tween™ 20 con Proclin (PBST con un conservante biocida). Se añadieron 20 µL de PBS a cada pocillo y las placas se cubrieron con un sello para placas negras y se conservaron a 4 °C antes de leerlas. Las placas se leyeron utilizando un instrumento Celloomics Arrayscan, realizando la lectura de la fluorescencia a 594 nm (punto de evaluación de 24h) o 488 nm (punto de evaluación de 5 h) para medir el nivel del receptor ERα en cada pocillo. La intensidad total media se normalizó según el número de células para obtener la intensidad total por célula. Los datos se exportaron a un paquete de software adecuado (tal como Origin) para realizar el análisis de ajuste de la curva. La reducción de la expresión del receptor ERα se expresó como un valor de CI<sub>50</sub> y se determinó calculando la concentración de compuesto necesaria para obtener una reducción de un 50% de la señal de intensidad total máxima media.

Aunque las propiedades farmacológicas de los compuestos de Fórmula (I) varían con los cambios estructurales como era de esperar, en general la actividad que poseen los compuestos de Fórmula (I) se puede demostrar para las siguientes concentraciones o dosis en una o más de las pruebas anteriores.

Se generaron los siguientes datos para los Ejemplos (los datos a continuación pueden ser el resultado de un único experimento o una media de múltiples experimentos repetidos):

**Tabla A**

Ejemplo	Valor de CI <sub>50</sub> para la unión de ER	Valor de CI <sub>50</sub> para la reducción de la expresión de ER
1	< 0.64	0.14
2	1	0.85
3	1	0.4
4	1.6	0.99
5	0.2	0.57
6	< 1.3	0.44
7	5	1.7
8	2.2	3
9	< 1.2	1.5

Estudio de xenoinjerto *in vivo* en MCF-7 con el Ejemplo 1 como único agente o combinado con un inhibidor de mTOR

5 Se implantaron células MCF7 ( $5 \times 10^6$  células suspendidas en 100  $\mu$ L de medio celular RPMI) subcutáneamente en el flanco trasero de ratones inmunodeficientes (SCID) el día después de haber implantado quirúrgicamente a cada ratón un pellet de estrógeno de 0.5 mg/21 días (Innovative Research, EE. UU.). Los tumores se midieron dos veces por semana y los cambios en el volumen del tumor y la inhibición del crecimiento se determinaron mediante la medición bilateral con un calibrador de Vernier (longitud x anchura), donde se consideró que la longitud era el diámetro más largo a través del tumor y la anchura era la perpendicular correspondiente. El volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{anchura}) \times \sqrt{(\text{longitud} \times \text{anchura}) \times \pi/6}$ .

10 Los tumores se midieron 13 días después del implante celular para permitir la distribución aleatoria de los ratones en los grupos de prueba. El tratamiento con los compuestos se inició el día después (es decir, 14 días después del implante celular).

15 El inhibidor de mTOR AZD2014 se administró a diferentes grupos de ratones con una dosis de 15 mg/kg una vez al día cada día por vía oral (p.o.) con un volumen de 0.1 mL por cada 10 g. En el Ejemplo 1, se administró una dosis de 5 mg/kg una vez al día por vía oral con 0.1 mL/10 g. A un grupo de animales se les administró una dosis de vehículo p.o. para que actuara como control. Se utilizaron nueve ratones por grupo para los agentes activos para el grupo de control.

Los datos obtenidos de este estudio se muestran en la Figura 10.

25 Se podría estudiar el efecto de una combinación de un compuesto de Fórmula (I) con un inhibidor de PI3K $\alpha/\delta$  de un modo similar al descrito anteriormente para la combinación con el inhibidor de mTOR.

Estudio sobre la eficacia de un xenoinjerto de HCC1428 carente de estrógeno durante un periodo prolongado (HCC1428 LTED)

30 Después de un periodo adecuado de cultivo celular, se implantaron células HCC1428 LTED ( $1 \times 10^6$ ) subcutáneamente en el flanco trasero de ratones NSG hembra inmunodeficientes (Jackson Labs, EE. UU.) que se habían sometido a una ooforectomía. Los tumores se midieron dos veces por semana y los cambios en el volumen del tumor y la inhibición del crecimiento se determinaron mediante la medición bilateral con un calibrador de Vernier (longitud x anchura), donde se consideró que la longitud era el diámetro más largo a través del tumor y la anchura era la perpendicular correspondiente. El volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula  $(\text{longitud} \times \text{anchura}) \times \sqrt{(\text{longitud} \times \text{anchura}) \times \pi/6}$ . Los tumores se midieron una vez por semana después del implante celular hasta que el tamaño medio alcanzó 150 mm<sup>3</sup>; en este punto, los ratones se distribuyeron en grupos de prueba aleatorios, conteniendo cada grupo 10 ratones. El tratamiento con los compuestos empezó el día después (día 62 en este estudio) y se siguieron midiendo los tumores una vez por semana. En el Ejemplo 1, se administró una dosis de 25 mg/kg una vez al día cada día por vía oral (p.o.) con un volumen de 0.1 mL por cada 10 g. A otro grupo de animales se les administró una dosis de vehículo p.o. para que actuara como control.

45 Después de 28 días de dosificación, los tumores tratados con control crecieron una media de 220 mm<sup>3</sup> (utilizando valores de media geométrica), mientras que el tamaño de los tumores de los ratones tratados con el Ejemplo 1 se redujo en 46 mm<sup>3</sup>, lo cual representa una inhibición de un 121% del crecimiento del tumor ( $P < 0.001$  para una prueba t no apareada).

50 Para medir los niveles de proteína receptora estrogénica en los tumores de los xenoinjertos, las muestras de los tumores se recolectaron 24 horas después de la dosis final de vehículo o de tratamiento con el Ejemplo 1 y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Para la extracción de la proteína, los fragmentos tumorales se añadieron a 700  $\mu$ L de tampón de extracción celular de Invitrogen (FNN0011) con inhibidores de fosfatasa de Sigma añadidos (N.º 2 (P5726) y 3 (P0044) con una dilución de 1 en 100) y el inhibidor de proteasas Complete de Roche (11836145001) (1 comprimido por cada 50 mL), ditiotreitól (DTT) 1 mM en tubos de muestras de 2 mL sobre agua-hielo. La homogeneización de la muestra se llevó a cabo utilizando un instrumento Mixermill (nivel 27/s) y 3 x ciclos de homogeneización de 2 min. Las muestras se centrifugaron brevemente para garantizar la homogeneización completa de los tumores. El homogeneizado se sonicó durante 10 segundos y a continuación se centrifugó en una centrífuga de alta velocidad (13 000 rpm) durante 15 min. Se midieron los niveles de proteína en el sobrenadante y se separaron aproximadamente 45  $\mu$ g de proteína en geles Bis-Tris de 15 pocillos (geles al 4-12%) utilizando métodos estándar. Tras separar la proteína y transferirla a un filtro de nitrocelulosa, se añadió el anticuerpo para el receptor estrogénico de 68 kDa: ThermoFisher SP1 #9101S, diluido con un factor de dilución 1:400 en leche/PBS/T, y se incubó durante toda la noche a 4 °C. El filtro se lavó 3x 5 min en ~ 20 mL de TBS/T 0.05% y un anticuerpo de detección secundario anti-conejo se diluyó con un factor de dilución 1:2000 en Marvel al 5% en TBS/T y se incubó durante 1 h a temp. amb. La señal se detectó utilizando el sustrato quimioluminiscente de duración prolongada SuperSignal West Dura y se cuantificó utilizando el software Syngene. Los niveles de la proteína vinculina se midieron como un control de carga utilizando V931 Sigma diluido

con un factor de dilución 1:10 000 en Marvel y un anticuerpo de detección anti-ratón. Los resultados de las Figuras 11 y 12 muestran que se observó una reducción de un 60% en los niveles de ER tras el tratamiento con el Ejemplo 1, en comparación con el control de vehículo.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

10 Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para una formulación en forma de comprimidos incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes de granulación y desintegración, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes conservantes y antioxidantes. Otro excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente quelante. Las formulaciones en forma de comprimidos pueden no estar recubiertas o se pueden recubrir, ya sea para modificar su desintegración y la absorción posterior del principio activo dentro del aparato digestivo, o para mejorar su estabilidad y/o apariencia, utilizando en ambos casos agentes y procedimientos de recubrimiento  
15 convencionales de uso común en la técnica.

20 Como alternativa, las composiciones para uso oral se pueden presentar en forma de cápsulas de gelatina dura, en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o un aceite.

25 Las suspensiones acuosas generalmente contienen el principio activo en forma de polvo fino junto con uno o más agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, antioxidantes, agentes colorantes, agentes saborizantes y/o agentes edulcorantes.

30 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal o en un aceite mineral. Las suspensiones oleosas también pueden contener un agente espesante. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los que se han mencionado anteriormente, y agentes saborizantes para proporcionar un preparado oral agradable al paladar. Estas composiciones se pueden conservar añadiendo un antioxidante.

35 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para preparar una suspensión acuosa mediante la adición de agua contienen generalmente el principio activo junto con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. También pueden estar presentes otros excipientes tales como edulcorantes, saborizantes y colorantes.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o una mezcla de cualquiera de estos. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes, saborizantes y conservantes.

45 Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes y también pueden contener un agente demulcente, conservante, saborizante y/o colorante.

50 Las composiciones farmacéuticas también se pueden presentar en forma de una suspensión oleosa o acuosa inyectable estéril, que se puede formular de acuerdo con procedimientos conocidos utilizando uno o más de los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, los cuales se han mencionado anteriormente. Un preparado inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un sistema diluyente o disolvente atóxico aceptable para la administración parenteral.

55 Las composiciones para la administración por inhalación se pueden presentar en forma de un aerosol presurizado convencional diseñado para dispensar el principio activo, ya sea como un aerosol que contiene un sólido finamente dividido o como microgotas líquidas. Se pueden emplear propelentes para aerosoles convencionales tales como hidrocarburos o hidrocarburos fluorados volátiles y el dispositivo de aerosol se diseña convenientemente para dispensar una cantidad controlada de principio activo. También pueden ser adecuados inhaladores de polvo seco.

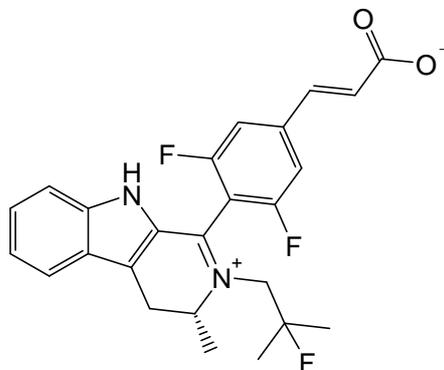
Para obtener más información sobre la formulación, se remite al lector al Capítulo 25.2 del Volumen 5 de *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch; Director del Comité Editorial), Pergamon Press 1990.

60 En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica descrita anteriormente comprende el compuesto del Ejemplo 1 [ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico] o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Convenientemente, el compuesto del Ejemplo 1 está presente en su forma polimórfica que se describe en la presente como la Forma cristalina B.

65 En el proceso para sintetizar el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico como se expone en el Ejemplo 1, se recomienda que el proceso

se lleve a cabo en ausencia de luz y con una atmósfera de nitrógeno con el fin de evitar la formación de un producto de degradación.

El producto de degradación al cual se refiere, que es (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ilo-1-il)fenil)acrilato, tiene la siguiente estructura:



y se cree que se puede formar a partir del Ejemplo 1 [ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilico] por autooxidación al aire mediante un mecanismo en cadena de radicales libres. Para disipar cualquier duda, no se cree que este producto de degradación tenga una actividad de SERD significativa.

Este compuesto también se podría denominar (*E*)-3-[3,5-difluoro-4-[(3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ilo-1-il]fenil]prop-2-enoato y en el Ejemplo 13 se muestra un método sintético para prepararlo.

El experto se dará cuenta de que el control de la formación de productos de degradación es esencial para la producción y el almacenamiento seguros de los productos farmacéuticos. Además, el experto se dará cuenta de que ciertos compuestos se pueden degradar al almacenarlos, incluso después de formularlos en una composición farmacéutica, y que dicha degradación se puede controlar en algunos casos utilizando excipientes adecuados en la composición farmacéutica y/o empaquetando el producto final de forma adecuada. El experto también se dará cuenta de que una formulación final que se desarrolle para un uso comercial deberá optimizarse por lo que respecta a una serie de características, que incluyen la estabilidad química, pero que también incluyen, por ejemplo, la estabilidad física y las características de disolución. Por consiguiente, tales formulaciones se desarrollarán con el fin de equilibrar una serie de factores diferentes.

Convenientemente, las composiciones del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, incluyen un compuesto que actúa como antioxidante.

Los compuestos antioxidantes adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, bisulfito de sodio-acetona; ácido alfa-lipoico; alfa-tocoferol; ácido ascórbico; palmitato de ascorbilo; hidroxianisol butilado; hidroxitolueno butilado; carotenos; ácido cítrico monohidratado; galato de dodecilo; ácido eritórbito; ácido fumárico; glutatona; histidina; ácido hipofosforoso; ácido lactobiónico; ácido lipoico; ácido málico; melatonina; metionina; D-manosa; monotioglicerol; galato de octilo; metabisulfito de potasio; ácido propiónico; galato de propilo; ascorbato de sodio; bisulfito de sodio; formaldehído-sulfoxilato de sodio; metabisulfito de sodio; sulfito de sodio; tiosulfato de sodio; cloruro de estaño (II); dióxido de azufre; timol; tocoferol; tocotrienoles; ubiquinol; ácido úrico; vitamina E y polietilenglicolsuccinato de vitamina E. Tales compuestos pueden ejercer su efecto antioxidante mediante varios mecanismos y uno o más de estos mecanismos pueden ser más eficaces que otros para un compuesto particular. Algunos compuestos antioxidantes, tales como BHA, actúan como atrapadores de radicales libres. Otros antioxidantes, tales como el metabisulfito de sodio y el ácido ascórbico, se oxidan fácilmente y por lo tanto se pueden oxidar de forma preferente con relación al principio activo.

Por ejemplo, cuando la formación de peróxidos inducida por metales está implicada en el mecanismo de oxidación, el uso de un agente quelante tal como, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiamintetraacético), puede ser útil para eliminar cualesquiera contaminantes metálicos y conseguir de este modo indirectamente un efecto estabilizante. En la técnica se conocen otros agentes quelantes de metales e incluyen, por ejemplo, la sal sódica del éter sulfobutílico y betadex; acetato de calcio; ácido cítrico monohidratado; ciclodextrinas; edetato de disodio; ácido edético; ácido fumárico; galactosa; ácido glutámico; histidina; hidroxipropilbetadex; ácido málico; ácido pentético; fitoquelatina; poli(éter metil vinílico/anhídrido maleico); citrato de potasio; citrato de sodio dihidratado; fosfato de sodio, dibásico; fosfato de sodio, monobásico; ácido tartárico y trealosa.

5 Por ejemplo, en las formulaciones ilustrativas del Ejemplo 1, se incluyeron galato de propilo, metabisulfito de sodio, ácido ascórbico e hidroxianisol butilado. También se incluyó EDTA. En el Ejemplo 12 se proporciona un ejemplo de una formulación de este tipo. Entre ellas, al parecer las composiciones que contenían metabisulfito de sodio resultaron ser menos estables que las que no contenían ningún antioxidante, después de almacenarlas durante cuatro semanas en una serie de condiciones diferentes de calor y humedad. Al parecer las composiciones que contenían ácido ascórbico fueron las más estables después de almacenarlas durante 4 semanas en una serie de condiciones diferentes de calor y humedad (según se determinó mediante análisis por cromatografía líquida, por ejemplo, UHPLC).

10 Otros aditivos adecuados para las formulaciones que comprenden el compuesto del Ejemplo 1 incluyen el uso de excipientes con un contenido bajo de metales, excipientes con un contenido bajo de peróxidos y excipientes tales como el manitol, el cual es un atrapador de radicales libres, así como también un relleno. El proceso para producir una formulación de este tipo también puede tener un impacto sobre la estabilidad. Por ejemplo, para algunos principios activos, el hecho de garantizar una mezcla íntima del principio activo con los excipientes que inducen estabilidad puede ser importante a la hora de garantizar una estabilización máxima. La mezcla íntima se puede ver influenciada, por ejemplo, por la velocidad de mezcla, los tamaños de las partículas y los procesos de granulación/mezcla por vía seca o húmeda. Un principio activo se puede granular con un antioxidante y a continuación mezclar con otros excipientes. Los antioxidantes también se pueden añadir a cualquier recubrimiento de la parte exterior de una composición farmacéutica.

25 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y que comprende además un oxidante. Convenientemente, se puede utilizar el ácido ascórbico como antioxidante.

35 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y que comprende además un agente quelante de metales. Convenientemente, se puede utilizar EDTA como agente quelante de metales.

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, un antioxidante y que además comprende opcionalmente un agente quelante de metales.

45 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 5% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.

50 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 2% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.

55 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 1% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.

60 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 0.5% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.

65

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 0.1% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 0.05% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.

15 En los aspectos anteriores, cuando se describe que la composición contiene menos de un 5% p/p, 2% p/p, 1% p/p, 0.5% p/p, 0.1% p/p o 0.05% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato, entonces el experto sobreentenderá que esto se refiere al porcentaje de peso por peso en comparación con el peso del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico presente en la composición.

20 Por consiguiente, el producto de degradación (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato se puede utilizar como un marcador de referencia o patrón de referencia en técnicas analíticas tales como la HPLC para monitorizar la estabilidad del compuesto del Ejemplo 1 o de las composiciones farmacéuticas que lo contienen.

25 La cantidad de principio activo que se combina con uno o más excipientes para producir una única forma farmacéutica variará necesariamente según el huésped tratado y la vía de administración particular. Por ejemplo, la administración oral a seres humanos generalmente requerirá, por ejemplo, de 1 mg a 2 g de agente activo (más adecuadamente de 100 mg a 2 g, por ejemplo, de 250 mg a 1.8 g, tal como de 500 mg a 1.8 g, particularmente de 500 mg a 1.5 g, de manera conveniente de 500 mg a 1 g), que se administran combinados con una cantidad adecuada y conveniente de excipientes que puede variar de aproximadamente un 3 a 30 aproximadamente un 98 por ciento en peso de la composición total. Se sobreentenderá que, si se requiere una dosis más alta, pueden ser necesarias formas farmacéuticas múltiples, por ejemplo, dos o más comprimidos o cápsulas, con la dosis de principio activo dividida de forma conveniente entre ellos. Normalmente, las formas farmacéuticas unitarias contendrán de aproximadamente 10 mg a 0.5 g de un compuesto de esta invención, aunque una forma farmacéutica unitaria puede contener hasta 1 g. De manera conveniente, una única forma 35 farmacéutica sólida puede contener entre 1 y 300 mg de principio activo.

Naturalmente, el tamaño de la dosis para fines terapéuticos o profilácticos de los compuestos de la presente invención variará dependiendo de la naturaleza y gravedad del estado patológico, la edad y el sexo del animal o 40 paciente y la vía de administración, de acuerdo con los principios de uso común en medicina.

Cuando los compuestos de la presente invención se utilicen con fines terapéuticos o profilácticos, generalmente se administrarán de forma que se suministre una dosis diaria comprendida en el rango, por ejemplo, de 1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, que se podrá administrar en dosis divididas si fuera necesario. En general, se 45 administrarán dosis más bajas cuando se emplee una vía parenteral. Así pues, por ejemplo, para la administración intravenosa, se utilizará generalmente una dosis comprendida en el rango, por ejemplo, de 1 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal. De forma similar, para la administración por inhalación, se utilizará una dosis comprendida en el rango, por ejemplo, de 1 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, se prefiere la administración oral, en particular en forma de comprimido.

50 En un aspecto de la invención, los compuestos de la presente invención, o las sales farmacéuticamente aceptables de estos, se administran como comprimidos que comprenden de 10 mg a 100 mg del compuesto de Fórmula (I) (o una sal farmacéuticamente aceptable de este), donde se administran uno o más comprimidos según sea necesario para alcanzar la dosis deseada.

55 Como se ha mencionado anteriormente, existe constancia de que la señalización a través ER $\alpha$  provoca tumorigénesis mediante uno o más de los efectos de la mediación de la proliferación de células cancerosas y otras células, la mediación de eventos angiogénicos y la mediación de la motilidad, migración e invasividad de las células cancerosas. Hemos descubierto que los compuestos de la presente invención poseen una actividad antitumoral potente que se cree que se obtiene mediante el antagonismo y la reducción de la expresión del ER $\alpha$  60 que participa en los pasos de transducción de señales que provocan la proliferación y supervivencia de las células tumorales y la invasividad y capacidad migratoria de las células tumorales metastásicas.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden ser valiosos como agentes antitumorales, en particular como inhibidores selectivos de la proliferación, supervivencia, motilidad, diseminación e invasividad de 65 las células cancerosas de mamífero, de este modo provocan la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia, así como la inhibición del crecimiento de tumores metastásicos. En particular, los compuestos de

- la presente invención pueden ser valiosos como agentes antiproliferativos y antiinvasivos en la contención y/o el tratamiento de enfermedades de tumor sólido. En particular, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a la inhibición de ER $\alpha$  y que participan en los pasos de transducción de señales que producen la proliferación y supervivencia de células tumorales y la capacidad migratoria e invasividad de las células tumorales metastásicas. Además, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de los tumores que están mediados únicamente o en parte por el antagonismo y la reducción de la expresión de ER $\alpha$ , es decir, los compuestos se pueden utilizar para producir un efecto inhibidor de ER $\alpha$  en un animal de sangre caliente que necesite dicho tratamiento.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso como un medicamento en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en la producción de un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en un animal de sangre caliente tal como un ser humano como un agente antiinvasivo en la contención y/o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para la producción de un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en la producción de un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en un animal de sangre caliente tal como un ser humano como un agente antiinvasivo en la contención y/o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a la inhibición de ER $\alpha$  que participan en los pasos de transducción de señales que producen la capacidad de proliferación, supervivencia, invasividad y migración de las células tumorales.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a

la inhibición de ER $\alpha$  que participan en los pasos de transducción de señales que producen la capacidad de proliferación, supervivencia, invasividad y migración de las células tumorales.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso con el fin de proporcionar un efector inhibidor sobre ER $\alpha$ .

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso con el fin de proporcionar un efector inhibidor sobre ER $\alpha$ .

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso con el fin de proporcionar un efector inhibidor selectivo sobre ER $\alpha$ .

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso con el fin de proporcionar un efector inhibidor selectivo sobre ER $\alpha$ .

20 En la presente se describen compuestos que se pueden unir al dominio de unión al ligando de ER $\alpha$  y que degradan de forma selectiva el receptor estrogénico. En ensayos bioquímicos y basados en células, se ha demostrado que los compuestos de la presente invención se unen de forma potente al receptor estrogénico y reducen los niveles celulares de ER $\alpha$ , por consiguiente, pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades o afecciones sensibles a estrógenos (incluidas las enfermedades que han desarrollado resistencia a terapias endocrinas), es decir, para el uso en el tratamiento de cáncer de mama y diferentes tipos de cáncer ginecológico (incluido el cáncer endometrial, cervical y de ovario) y diferentes tipos de cáncer que expresan proteínas ER $\alpha$  mutadas, las cuales pueden ser mutaciones nuevas o que hayan surgido como resultado del tratamiento con una terapia endocrina anterior tal como un inhibidor de aromatasas.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama o cáncer ginecológico.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, endometrio, ovario o cuello uterino.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, donde el cáncer ha desarrollado resistencia a una o más terapias endocrinas diferentes.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de mama o cáncer ginecológico.

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, endometrio, ovario o cuello uterino.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de mama.

60 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, donde el cáncer ha desarrollado resistencia a una o más terapias endocrinas diferentes.

65 En una característica de la invención, el cáncer que se ha de tratar es cáncer de mama. En un aspecto adicional de esta característica, el cáncer de mama es positivo para receptores estrogénicos (ER+vo). En una realización

de este aspecto, el compuesto de Fórmula (I) se administra combinado con otro agente contra el cáncer tal como un agente antihormonal según se define en la presente.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente para su uso en el tratamiento del cáncer de mama ER+vo.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se ha definido anteriormente en la presente en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de mama ER+vo.

15 Según se ha indicado anteriormente en la presente, los efectos *in vivo* de un compuesto de Fórmula (I) pueden ser ejercidos en parte por uno o más metabolitos que se forman en el cuerpo humano o animal después de la administración de un compuesto de Fórmula (I).

En todos los usos anteriores, un compuesto adecuado de Fórmula (I) es el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En un aspecto, el Ejemplo 1 se presenta como la Forma cristalina B, según se ha descrito en la presente.

20 El tratamiento contra el cáncer definido en la presente se puede aplicar como una única terapia o puede incluir, además de los compuestos de la invención, cirugía convencional, radioterapia o quimioterapia. Dicha quimioterapia puede incluir una o más de las siguientes categorías de agentes antitumorales:

25 (i) otros fármacos antiproliferativos/antineoplásticos y combinaciones de estos, como los que se emplean en oncología médica, tales como agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, melfalán, clorambucil, busulfán, temozolamida y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo, gemcitabina y antifolatos tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina e hidroxurea); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimitóticos (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina, y taxoides como taxol y taxotere, e inhibidores de polocinasas); e inhibidores de topoisomerasas (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán y camptotecina);

35 (ii) agentes antihormonales tales como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), progestógenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasas (por ejemplo, como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano);

40 (iii) inhibidores de la función de los factores de crecimiento y sus vías de señalización posteriores: se incluyen moduladores de Ab de cualquier factor de crecimiento o dianas de receptores de los factores de crecimiento, que han sido revisados por Stern *et al.* *Critical Reviews in Oncology/Haematology*, 2005, 54, págs. 11-29); también se incluyen inhibidores de tales dianas que son moléculas de peso molecular bajo, por ejemplo, inhibidores de cinasas - algunos ejemplos incluyen el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], el anticuerpo anti-EGFR panitumumab, el anticuerpo anti-EGFR cetuximab [Erbitux, C225] e inhibidores de tirosina-cinasas, que incluyen inhibidores de la familia de receptores de erbB, tales como los inhibidores de tirosina-cinasas de receptores de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGFR/erbB1) tales como gefitinib o erlotinib, inhibidores de tirosina-cinasas de erbB2 tales como lapatinib, e inhibidores mixtos erb1/2 tales como afatanib; existen estrategias similares disponibles para otras clases de factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, inhibidores de la familia de factores de crecimiento de hepatocitos o sus receptores, incluidos c-met y ron; inhibidores de la insulina y la familia de factores de crecimiento de la insulina o sus receptores (IGFR, IR), inhibidores de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas o sus receptores (PDGFR), e inhibidores de la señalización mediada por otras tirosina-cinasas de receptores tales como c-kit, AnLK y CSF-1R;

55 también se incluyen moduladores que tienen como diana las proteínas de señalización en la vía de señalización de PI3-cinasas, por ejemplo, inhibidores de isoformas de PI3-cinasas tales como PI3K- $\alpha/\beta/\gamma$  y ser/thr-cinasas tales como AKT, mTOR (tal como AZD2014), PDK, SGK, PI4K o PIP5K; también se incluyen inhibidores de serina/treonina-cinasas no mencionados anteriormente, por ejemplo, inhibidores de raf tales como vemurafenib, inhibidores de MEK tales como selumetinib (AZD6244), inhibidores de Abl tales como imatinib o nilotinib, inhibidores de Btk tales como ibrutinib, inhibidores de Syk tales como fostamatinib, inhibidores de aurora-cinasas (por ejemplo, AZD1152), inhibidores de otras ser/thr-cinasas tales como JAK, STAT e IRAK4, e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas tales como palbociclib;

60 iv) moduladores de las vías de señalización de daños de ADN, por ejemplo, inhibidores de PARP (p. ej., Olaparib), inhibidores de ATR o inhibidores de ATM;

65

v) moduladores de las vías apoptóticas y de muerte celular tales como moduladores de la familia Bcl (p. ej., ABT-263 / Navitoclax, ABT-199);

(vi) agentes antiangiogénicos tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular [por ejemplo, el anticuerpo anti-factor del crecimiento celular endotelial vascular bevacizumab (Avastin™) y, por ejemplo, un inhibidor de tirosina-cinasas de receptores de VEGF tal como sorafenib, axitinib, pazopanib, sunitinib y vandetanib (y compuestos que funcionan mediante otros mecanismos (por ejemplo, linomida, inhibidores de la función de la integrina  $\alpha v\beta 3$  y angiostatina)];

(vii) agentes que producen daños vasculares tales como Combretastatina A4;

(viii) agentes antiinvasión, por ejemplo, inhibidores de la familia de c-Src-cinasas como dasatinib (*J. Med. Chem.*, 2004, 47, 6658-6661) y bosutinib (SKI-606), e inhibidores de metaloproteinasas como marimastat, inhibidores de la función de receptores activadores del plasminógeno de tipo urocinasa o anticuerpos contra la heparanasa;

(ix) estrategias de inmunoterapia, que incluyen, por ejemplo, estrategias *ex-vivo* e *in-vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tales como la transfección con citocinas tales como la interleucina 2, la interleucina 4 o el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos, estrategias para disminuir la anergia de los linfocitos T, estrategias que utilizan células inmunitarias transfectadas tales como células dendríticas transfectadas con citocinas, estrategias que utilizan líneas celulares tumorales transfectadas con citocinas y estrategias que utilizan anticuerpos antiidiotípicos. Algunos ejemplos específicos incluyen anticuerpos monoclonales que tienen como diana PD-1 (p. ej., BMS-936558) o CTLA4 (p. ej., ipilimumab y tremelimumab);

(x) terapias basadas en ARNi o antisentido, por ejemplo, las que están dirigidas a las dianas enumeradas;

(xi) estrategias de terapia génica, que incluyen, por ejemplo, estrategias para reemplazar genes aberrantes tales como el gen p53 aberrante o los BRCA1 o BRCA2 aberrantes, estrategias GDEPT (terapia con profármacos activados enzimáticamente dirigida por genes) tales como las que utilizan citosina-desaminasa, timidina-cinasa o una enzima nitroreductasa bacteriana y estrategias para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o radioterapia tales como la terapia génica para tratar la resistencia a múltiples fármacos.

De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende los compuestos de la presente invención según se han definido anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable de estos y otro agente antitumoral, en particular cualquiera de los agentes antitumorales enumerados en los apartados (i)-(xi) anteriormente. En particular, el agente antitumoral enumerado en los apartados (i)-(xi) anteriormente es el estándar de atención médica para el cáncer específico que se ha de tratar; el experto en la técnica comprenderá el significado de "estándar de atención médica". En un aspecto, el compuesto de la presente invención es el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporcionan compuestos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de estos combinados con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)-(xi) anteriormente en la presente.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el Ejemplo 1 [ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico] o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)-(xi) anteriormente en la presente.

En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan compuestos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de estos combinados con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en el apartado (i) anteriormente.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de la presente invención según se ha definido anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable de este y cualquiera de los agentes antitumorales enumerados en el apartado (i) anteriormente.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con cualquiera de los agentes antitumorales enumerados en el apartado (i) anteriormente.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende compuestos de la presente invención según se han definido anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable de estos y un taxoide tal como, por ejemplo, taxol o taxotere, convenientemente taxotere. Por ejemplo, un compuesto adecuado de la invención combinado con un taxoide tal

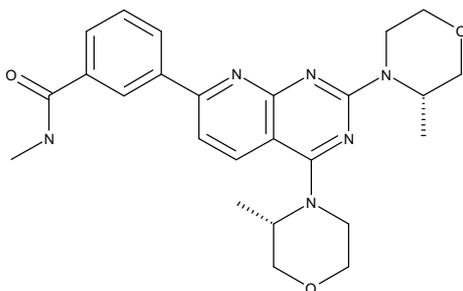
como, por ejemplo, taxol o taxotere, convenientemente taxotere, es el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

5 En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan compuestos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de estos combinados con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en el apartado (ii) anteriormente en la presente.

10 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende compuestos de la presente invención según se han definido anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable de estos y cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente.

15 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de mTOR tal como AZD2014 (remítase, por ejemplo, a WO2008/023161).



25

AZD2014

30 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de PI3K $\alpha$  tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163 en tramitación conjunta con la presente. Un ejemplo de un inhibidor de PI3K  $\alpha/\delta$  adecuado es el Ejemplo 3 de PCT/GB2014/050163, el cual es el compuesto 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-*etil-1H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de esta. En el

35 Ejemplo de referencia 1 de la presente se expone un proceso para preparar el Ejemplo 3 de PCT/GB2014/050163.

40 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y palbociclib.

45 En un aspecto, la combinación anterior de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en particular el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con un agente antitumoral enumerado en el apartado (ii) anteriormente, o un inhibidor de mTOR (tal como AZD2014), o un inhibidor de PI3K- $\alpha$  (tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, en particular el Ejemplo 3 de esta) o palbociclib, es adecuada para su uso en el tratamiento de un cáncer de mama o un cáncer ginecológico, tal como un cáncer de mama, endometrio, ovario o cuello uterino, en particular un cáncer de mama tal como un cáncer de mama ER+vo.

50 En la presente, cuando se utiliza el término "combinación", se debe sobreentender que se refiere a la administración simultánea, secuencial o por separado. En un aspecto de la invención, el término "combinación" se refiere a la administración simultánea. En otro aspecto adicional de la invención, el término "combinación" se refiere a la administración por separado. En un aspecto adicional de la invención, el término "combinación" se refiere a la administración secuencial. Cuando la administración sea secuencial o por separado, la dilación en la administración del segundo componente no deberá ser tal que haga perder el efecto beneficioso de la combinación. Cuando una combinación de dos o más componentes se administre de forma secuencial o por

55 separado, se deberá sobreentender que la pauta posológica para cada componente puede ser diferente e

independiente a la de los demás componentes. Convenientemente, los compuestos de la presente invención se administran una vez al día.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 [ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico] o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

25 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de mTOR, tal como AZD2014 (remítase, por ejemplo, a WO2008/023161), asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de PI3K $\alpha$  tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Un ejemplo de un inhibidor de PI3K  $\alpha/\delta$  adecuado es el Ejemplo 3 de PCT/GB2014/050163, según se ha descrito anteriormente en la presente.

35 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y palbociclib, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

40 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas anteriores de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en particular el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con un agente antitumoral enumerado en el apartado (ii) anteriormente, o un inhibidor de mTOR (tal como AZD2014), o un inhibidor de PI3K- $\alpha$  (tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, en particular el Ejemplo 3 de esta) o palbociclib, son adecuadas para su uso en el tratamiento de un cáncer de mama o un cáncer ginecológico, tal como un cáncer de mama, endometrio, ovario o cuello uterino, en particular un cáncer de mama tal como un cáncer de mama ER+vo.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer.

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer.

5 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de mTOR, tal como AZD2014 (remítase, por ejemplo, a WO2008/023161), asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer.

15 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de PI3K $\alpha$  tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer. Un ejemplo de un inhibidor de PI3K  $\alpha/\delta$  adecuado es el Ejemplo 3 de PCT/GB2014/050163, según se ha descrito anteriormente en la presente.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y palbociclib, asociado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del cáncer.

25 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas anteriores de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en particular el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con un agente antitumoral enumerado en el apartado (ii) anteriormente, o un inhibidor de mTOR (tal como AZD2014), o un inhibidor de PI3K- $\alpha$  (tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, en particular el Ejemplo 3 de esta) o palbociclib, son adecuadas para su uso en el tratamiento de un cáncer de mama o un cáncer ginecológico, tal como un cáncer de mama, endometrio, ovario o cuello uterino, en particular un cáncer de mama tal como un cáncer de mama ER+vo.

35 De acuerdo con otra característica de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)-(xi) anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

40 De acuerdo con otra característica de la invención, se proporciona el uso del Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)-(xi) anteriormente en la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso contra el cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

50 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con cualquiera de los agentes antihormonales enumerados en el apartado (ii) anteriormente, por ejemplo, cualquiera de los antiestrógenos enumerados en el apartado (ii) anteriormente o, por ejemplo, un inhibidor de aromatasas enumerado en el apartado (ii) anteriormente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

55 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un inhibidor de mTOR, tal como AZD2014 (remítase, por ejemplo, a WO2008/023161), en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

60 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un inhibidor de PI3K $\alpha$  tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

Un ejemplo de un inhibidor de PI3K  $\alpha/\delta$  adecuado es el Ejemplo 3 de PCT/GB2014/050163, según se ha descrito anteriormente en la presente.

5 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con palbociclib, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer en un animal de sangre caliente tal como un ser humano.

10 En un aspecto, los usos anteriores de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en particular el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, combinado con un agente antitumoral enumerado en el apartado (ii) anteriormente, o un inhibidor de mTOR (tal como AZD2014), o un inhibidor de PI3K- $\alpha$  (tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163, en tramitación conjunta con la presente, en particular el Ejemplo 3 de esta) o palbociclib, son adecuados para el uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer de mama o un cáncer ginecológico, tal como un cáncer de mama, endometrio, ovario o cuello uterino, en particular un cáncer de mama tal como un cáncer de mama ER+vo.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en el apartado (i) o (ii) anteriormente en la presente.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende:

a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este en una primera forma farmacéutica unitaria;

30 b) un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente en una segunda forma farmacéutica unitaria; y

(c) un medio de envase para contener dichas primera y segunda formas farmacéuticas.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende:

a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este en una primera forma farmacéutica unitaria;

40 b) un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(ii) anteriormente en la presente en una segunda forma farmacéutica unitaria; y

(c) un medio de envase para contener dichas primera y segunda formas farmacéuticas.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este combinado con un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en el apartado (i) o (ii) anteriormente en la presente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende:

55 a) el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este en una primera forma farmacéutica unitaria;

b) un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(xi) anteriormente en la presente en una segunda forma farmacéutica unitaria; y

60 (c) un medio de envase para contener dichas primera y segunda formas farmacéuticas.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende:

a) el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este en una primera forma farmacéutica unitaria;

65

b) un agente antitumoral seleccionado entre uno de los que se enumeran en los apartados (i)–(ii) anteriormente en la presente en una segunda forma farmacéutica unitaria; y

(c) un medio de envase para contener dichas primera y segunda formas farmacéuticas.

5

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende:

a) el Ejemplo 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este en una primera forma farmacéutica unitaria;

10

b) un agente antitumoral seleccionado entre AZD2014, un inhibidor de PI3K $\alpha$  (tal como los inhibidores de PI3K  $\alpha/\delta$  descritos en nuestra solicitud de PCT PCT/GB2014/050163 en tramitación conjunta con la presente) y palbociclib en una segunda forma farmacéutica unitaria; y

15

(c) un medio de envase para contener dichas primera y segunda formas farmacéuticas.

En todos los métodos, usos y otros aspectos anteriores, cuando se utiliza el compuesto del Ejemplo 1, se utiliza convenientemente como la Forma cristalina B.

20

La terapia combinada que se ha descrito anteriormente se puede añadir a la terapia estándar de atención médica que se lleva a cabo habitualmente de acuerdo con su programa de prescripción común.

25

Aunque los compuestos de Fórmula (I) son valiosos principalmente como agentes terapéuticos para su uso en animales de sangre caliente (incluido el ser humano), estos también son útiles siempre que sea necesario inhibir ER- $\alpha$ . Por lo tanto, son útiles como estándares farmacológicos para su uso en el desarrollo de nuevas pruebas biológicas y en la investigación de nuevos agentes farmacológicos.

#### Asistencia sanitaria personalizada

30

Otro aspecto de la presente invención se basa en la identificación de una relación entre el estado del gen que codifica ER $\alpha$  y una susceptibilidad potencial al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I). En particular, el estado del gen ER $\alpha$  puede indicar que es menos probable que un paciente responda a la terapia hormonal existente (tal como inhibidores de la aromataasa), en parte al menos porque se piensa que algunas mutaciones de ER $\alpha$  surgen como mecanismos de resistencia a los tratamientos existentes. Un SERD, en particular un SERD que se puede administrar por vía oral en dosis potencialmente mayores sin inconvenientes excesivos, se podrá entonces utilizar convenientemente para tratar pacientes con mutaciones de ER $\alpha$  que puede que sean resistentes a otras terapias. Por lo tanto, esto proporciona oportunidades, métodos y herramientas para seleccionar pacientes para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), en particular pacientes con cáncer. La presente invención se refiere a métodos y herramientas de selección de pacientes (que incluyen la medicina personalizada). La selección se basa en determinar si las células tumorales que se van a tratar poseen un gen ER $\alpha$  natural o mutado. Por lo tanto, el estado del gen ER $\alpha$  se podría utilizar como un biomarcador para indicar que la selección de un tratamiento con un SERD puede ser conveniente. Para disipar cualquier duda, los compuestos de fórmula (I) según se han definido en la presente se piensa que son similarmente activos frente a genes ER $\alpha$  naturales y mutados, al menos aquellas mutaciones en el gen ER $\alpha$  identificadas en la fecha de la presentación de esta solicitud.

45

Claramente se necesitan biomarcadores que seleccionen pacientes, o que aumenten su número, cuyos tumores responderán al tratamiento con un SERD, tal como un compuesto de Fórmula (I). Los biomarcadores para la selección de pacientes que identifican los pacientes que será más probable que respondan a un agente antes que a otro son ideales en el tratamiento del cáncer, ya que reducen el tratamiento innecesario de pacientes con tumores que no responden a los efectos secundarios potenciales de tales agentes.

50

Se puede describir un biomarcador como “una característica que se mide y se evalúa de manera objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”. Un biomarcador es cualquier indicador identificable y medible asociado con una afección o enfermedad particular donde existe una correlación entre la presencia o el nivel del biomarcador y algún aspecto de la afección o enfermedad (que incluye la presencia de la afección o enfermedad, su nivel o cambio de nivel, su tipo, su etapa, la susceptibilidad a ella o el grado de respuesta a un fármaco utilizado para tratar la afección o enfermedad). La correlación puede ser cualitativa, cuantitativa o tanto cualitativa como cuantitativa. Normalmente un biomarcador es un compuesto, un fragmento de un compuesto o un grupo de compuestos. Tales compuestos pueden ser cualquier compuesto detectado en un organismo o producido por este, que incluye proteínas (y péptidos), ácidos nucleicos y otros compuestos.

55

60

Los biomarcadores pueden tener poder predictivo, y como tales se pueden utilizar para predecir o detectar la presencia, nivel, tipo o etapa de enfermedades o afecciones particulares (que incluyen la presencia o nivel de microorganismos o toxinas particulares), la susceptibilidad (que incluye la susceptibilidad genética) a afecciones o enfermedades particulares, o la respuesta a tratamientos particulares (que incluye los tratamientos

65

farmacológicos). Se cree que los biomarcadores desempeñarán una función cada vez más importante en el futuro del descubrimiento y desarrollo de fármacos y mejorarán la eficacia de los programas de investigación y desarrollo. Se pueden utilizar biomarcadores como agentes diagnósticos, compuestos para monitorizar la progresión de la enfermedad, compuestos para monitorizar el tratamiento y para predecir el desenlace clínico. Por ejemplo, varios proyectos de investigación con biomarcadores están tratando de identificar marcadores de cánceres específicos y de enfermedades inmunológicas y cardiovasculares específicas. Se cree que el desarrollo de nuevos biomarcadores validados conllevará tanto reducciones significativas en los costes del desarrollo de fármacos y asistencia sanitaria como mejoras significativas en el tratamiento para una gran variedad de enfermedades y afecciones.

Con el fin de diseñar de manera óptima ensayos clínicos y de obtener la mayor información posible a partir de estos ensayos, puede requerirse un biomarcador. El marcador puede ser cualquier compuesto medible en tejidos tumorales y sustitutos. Idealmente estos marcadores también se correlacionarán con la eficacia y, por lo tanto, en última instancia se podrá utilizar para la selección de pacientes.

Por lo tanto, el problema técnico subyacente a este aspecto de la presente invención es la identificación de medios para clasificar pacientes para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I). El problema técnico se resuelve mediante el suministro de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva de la presente.

Se cree que los tumores que contienen ER $\alpha$  natural son susceptibles al tratamiento con un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, como un tratamiento de primera línea. Los tumores puede que también respondan al tratamiento con un compuesto de fórmula (I) como una terapia de segunda línea, tercera línea o posterior y esto puede ser útil, en particular, cuando los tumores contengan ER $\alpha$  mutado y, por lo tanto, sean resistentes a las terapias existentes tales como con IA. En un contexto de resistencia, puede requerirse una dosis más elevada de un compuesto de fórmula (I) que con tumores naturales.

La invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de las células a un compuesto de Fórmula (I). El método comprende determinar el estado del gen ER $\alpha$  en dichas células. Se define una célula como sensible a un compuesto de Fórmula (I) si inhibe el incremento en el número de células en un ensayo de crecimiento celular (ya sea mediante la inhibición de la proliferación celular y/o mediante un aumento de la muerte celular). Los métodos de la invención son útiles para predecir que células es más probable que respondan a un compuesto de Fórmula (I) mediante la inhibición del crecimiento.

Una muestra "representativa del tumor" puede ser la propia muestra aislada del tumor, o puede ser una muestra que se ha procesado adicionalmente, p. ej., una muestra de ácido nucleico amplificado por PCR que procede de la muestra tumoral.

#### *Definiciones*

En esta sección relativa a la asistencia sanitaria personalizada:

El término "alelo" se refiere a una forma particular de un locus genético, que se distingue de otras formas por su secuencia de nucleótidos o aminoácidos particular.

Las "reacciones de amplificación" son reacciones de ácidos nucleicos que dan como resultado una amplificación específica de los ácidos nucleicos diana respecto a los ácidos nucleicos que no son diana. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción de amplificación muy conocida.

El término "cáncer" se utiliza en la presente para referirse al crecimiento neoclásico consecuencia de la transformación celular en un fenotipo neoplástico. Tales transformaciones celulares a menudo conllevan una mutación genética.

El "gen" es un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, que incluye un promotor, exones, intrones y otros elementos de la secuencia que pueden estar ubicados dentro de las regiones flanqueantes 5' o 3' (no dentro de las porciones transcritas del gen) que controlan la expresión.

El "estado del gen" se refiere a si el gen es natural o no (es decir, mutado).

La "marca" se refiere a una composición capaz de producir una señal detectable indicadora de la presencia de un polinucleótido diana en una muestra de ensayo. Las marcas adecuadas incluyen radioisótopos, nucleótidos cromóforos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminiscentes y similares. Como tal, una marca es cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

La “variación no sinónima” se refiere a una variación (varianza) en la secuencia codificante de un gen o un solapamiento en esta que conlleva la producción de una secuencia polipeptídica distinta (alterada). Estas variaciones puede que afecten o que no afecten la función de la proteína e incluyen las variantes de un aminoácido (que conllevan la sustitución de un aminoácido por otro), variantes terminadoras (que conllevan un polipéptido truncado debido a la generación de un codón de parada prematuro) y variantes de inserción/delección.

La “variación sinónima” se refiere a una variación (varianza) en la secuencia codificante de un gen que no afecta a la secuencia del polipéptido codificado. Estas variaciones pueden afectar a la función de la proteína indirectamente (por ejemplo, alterando la expresión del gen), pero, en ausencia de indicios de lo contrario, generalmente se asume que son inocuas.

El “ácido nucleico” se refiere a moléculas de ADN y ARN monocatenarias o bicatenarias que incluyen ácidos nucleicos naturales observados en la naturaleza y/o ácidos nucleicos artificiales, modificados que tienen bases o esqueletos modificados, tal y como se sabe en la técnica.

El “cebador” se refiere a una secuencia oligonucleotídica de ADN monocatenario capaz de actuar como un punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico que se va a copiar. La longitud y la secuencia del cebador debe ser tal que sea capaz de cebar la síntesis de productos de extensión. Un cebador típico tiene una longitud de al menos aproximadamente 7 nucleótidos de una secuencia sustancialmente complementaria a la secuencia diana, pero se prefieren cebadores un poco más largos. Normalmente, los cebadores contienen aproximadamente 15-26 nucleótidos, pero también se pueden emplear otros cebadores más largos o más cortos.

Un “sitio polimórfico” es una posición dentro de un locus en la cual se observan al menos dos secuencias alternativas en una población.

El término “polimorfismo” se refiere a la variación de la secuencia observada en un individuo en un sitio polimórfico. Los polimorfismos incluyen sustituciones, inserciones, deleciones y microsatélites de nucleótidos y pueden, pero no necesariamente, conllevar diferencias detectables en la expresión génica o la función de la proteína. En ausencia de indicios de un efecto en la expresión o función de la proteína, los polimorfismos comunes, que incluyen variantes no sinónimas, se consideran por lo general incluidos en la definición de la secuencia génica natural. NCBI mantiene un catálogo de polimorfismos humanos y la anotación asociada, que incluye la validación, frecuencias observadas y asociación con la enfermedad (dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Nótese que el término “polimorfismo” cuando se utiliza en el contexto de secuencias génicas no se debe confundir con el término “polimorfismo” cuando se utiliza en el contexto de la forma en estado sólido de un compuesto, que es la naturaleza cristalina o amorfa de un compuesto. El experto en la técnica entenderá el significado previsto por el contexto.

El término “sonda” se refiere a oligonucleótidos con una secuencia específica monocatenaria que tiene una secuencia que es exactamente complementaria a la secuencia diana del alelo que se va a detectar.

La “respuesta” se define mediante las medidas tomadas de acuerdo con el Criterio de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST, por sus siglas en inglés) que conllevan la clasificación de los pacientes en dos grupos principales: aquellos que muestran una respuesta parcial o una enfermedad estable y aquellos que muestran signos de enfermedad progresiva.

La expresión “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a una incubación durante toda la noche a 42 °C en una solución que comprende un 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 pg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en 0.1x SSC a aproximadamente 65 °C.

El término “supervivencia” engloba la supervivencia global y la supervivencia sin progresión de los pacientes.

La “supervivencia global” (OS, por sus siglas en inglés) se define como el tiempo transcurrido desde el inicio de la administración del fármaco hasta la muerte debida a cualquier causa. La “supervivencia sin progresión” (PFS, por sus siglas en inglés) se define como el tiempo transcurrido desde el inicio de la administración del fármaco hasta la primera aparición de la enfermedad progresiva o la muerte debida a cualquier causa.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), donde el método comprende proporcionar una muestra que contiene células tumorales procedentes de un paciente; determinar si el gen ERα en la muestra que contiene células tumorales del paciente es natural o mutado; y seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) en función de esto.

65

El método puede incluir o excluir el propio paso de aislamiento de la muestra del paciente. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), donde el método comprende determinar si el gen ER $\alpha$  en una muestra que contiene células tumorales aislada previamente del paciente es natural o mutado; y seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) en función de esto.

En una realización, se selecciona al paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) si el ADN de la célula tumoral tiene un gen ER $\alpha$  mutado. En otras realizaciones, se selecciona un paciente cuyo ADN de la célula tumoral posee un gen ER $\alpha$  natural para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I).

A efectos de esta invención, un estado del gen natural se pretende que indique la expresión normal o apropiada del gen y la función normal de la proteína codificada. Por el contrario, el estado mutado se pretende que indique la expresión de una proteína con una función alterada, coherente con las funciones conocidas de los genes ER $\alpha$  mutados en el cáncer (tal como se describe en la presente). Cualquier número de alteraciones genéticas o epigenéticas que incluyen, sin carácter limitante, una mutación, amplificación, delección, transposición genómica o cambios en el perfil de metilación, pueden conllevar un estado mutado. Sin embargo, si a pesar de todo tales alteraciones dan como resultado una expresión apropiada de la proteína normal o una variante funcionalmente equivalente, entonces se considera que el estado del gen es natural. Algunos ejemplos de variantes que normalmente no conllevarían un estado de gen mutado funcional incluyen las variantes codificantes sinónimas y los polimorfismos comunes (sinónimos o no sinónimos). Tal como se discute posteriormente, el estado del gen se puede evaluar mediante un ensayo funcional o se puede inferir a partir de la naturaleza de las desviaciones detectadas respecto a una secuencia de referencia.

En ciertas realizaciones, el estado natural o mutado del gen ER $\alpha$  se determina mediante la presencia o ausencia de variaciones de ácido nucleico no sinónimas en los genes. Las variaciones no sinónimas observadas correspondientes a polimorfismos comunes conocidos sin efectos funcionales anotados no contribuyen a un estado del gen mutado.

Otras variaciones en el gen ER $\alpha$  que significan un estado mutado incluyen las variaciones del sitio de corte y empalme que disminuyen el reconocimiento de una unión intrón/exón durante el procesamiento del pre-ARNm en ARNm. Esto puede conllevar la omisión de un exón o la inclusión de una secuencia normalmente intrónica en el ARNm que ha experimentado corte y empalme (retención de un intrón o utilización de uniones de corte y empalme crípticas). A su vez, esto puede conllevar la producción de una proteína aberrante con inserciones y/o delecciones respecto a la proteína normal. Por lo tanto, en otras realizaciones, el gen tiene un estado mutado si existe una variante que altere la secuencia de reconocimiento del sitio de corte y empalme en una unión intrón/exón.

Para ESR1, se pueden consultar secuencias de referencia para el gen (número de acceso GenBank: NG\_008493), ARNm (número de acceso GenBank: NM\_000125) y la proteína (número de acceso GenBank: NP\_000116 o acceso Swiss-Prot: P03372). Un experto en la técnica será capaz de determinar el estado del gen ESR1, es decir, si un gen ESR1 particular es natural o mutado, en función de la comparación de la secuencia del ADN o la proteína con la natural.

Será evidente que las secuencias del gen y ARNm descritas para el gen ER $\alpha$  son secuencias representativas. En individuos normales, existen dos copias de cada gen, una copia materna y una paterna, que probablemente tendrán algunas diferencias en la secuencia, además dentro de una población existirán numerosas variantes alélicas de la secuencia del gen. Otras secuencias consideradas naturales incluirán aquellas que poseen uno o más cambios sinónimos en la secuencia del ácido nucleico (cuyos cambios no alteran la secuencia de la proteína codificada), polimorfismos comunes no sinónimos (p. ej., polimorfismos de la línea germinal) los cuales alteran la secuencia de la proteína pero no afectan a la función de la proteína y cambios en la secuencia de un sitio que no es de corte y empalme intrónica.

El experto en la técnica dispone de numerosas técnicas para determinar el estado del gen ER $\alpha$ . El estado del gen se puede determinar mediante la determinación de la secuencia de ácido nucleico. Esto puede realizarse mediante la secuenciación directa del gen completo o el análisis de sitios específicos dentro del gen, p. ej., sitios mutados comúnmente.

#### *Muestras*

La muestra del paciente que se va estudiar para determinar el estado del gen puede ser cualquier tejido tumoral o muestra que contiene células tumorales obtenidas o que se pueden obtener a partir del individuo. La muestra de prueba es convenientemente una muestra de sangre, un frotis bucal, una biopsia u otro tejido o fluido corporal obtenido a partir de un individuo. Algunos ejemplos particulares incluyen: células tumorales circulantes, ADN circulante en el plasma o suero, células aisladas del fluido ascítico de pacientes con cáncer de ovario, esputo pulmonar en los pacientes con tumores en los pulmones, un aspirado con una aguja fina de un paciente con

cáncer de mama, orina, sangre periférica, un raspado celular, un folículo piloso, un corte de piel o una muestra bucal.

5 Se comprenderá que la muestra de prueba puede ser igualmente una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia en la muestra de prueba, es decir que toda o parte de la región en el ácido nucleico de prueba se puede amplificar en primer lugar utilizando cualquier técnica convencional, p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR), antes del análisis. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN de células íntegras o fraccionadas. En realizaciones particulares, el ARN es ARN de una célula íntegra y se utiliza directamente como el molde para marcar una primera hebra de ADNc utilizando cebadores aleatorios o  
10 cebadores de poliA. El ácido nucleico o la proteína en la muestra de prueba se puede extraer a partir de la muestra de acuerdo con metodologías estándar (remítase a Green & Sambrook, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4.ª edición, vol. 1-3, ISBN 9781936113422) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

15 Los métodos diagnósticos de la invención se pueden realizar utilizando una muestra extraída previamente del individuo o paciente. Tales muestras se pueden conservar congelándolas o fijándolas e incluyéndolas en formalina-parafina u otro medio. Como alternativa, se puede obtener y utilizar una muestra que contiene células tumorales frescas.

20 Los métodos de la invención se pueden aplicar utilizando células procedentes de cualquier tumor. Los tumores adecuados para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) se han descrito anteriormente en la presente.

#### *Métodos para la detección de ácidos nucleicos*

25 En el contexto de la presente invención, se puede utilizar la detección de ácidos nucleicos de ER $\alpha$  mutados para seleccionar el tratamiento farmacológico. Debido a que las mutaciones en estos genes ocurren a nivel de ADN, los métodos de la invención pueden basarse en la detección de mutaciones o varianzas en el ADN genómico, así como también de los propios transcritos y proteínas. Puede que se quiera confirmar las mutaciones en el ADN genómico mediante el análisis de transcritos y/o polipéptidos, con el fin de garantizar que la mutación detectada se expresa realmente en el sujeto.  
30

Será evidente para el experto en la técnica que existe un gran número de procedimientos analíticos que se pueden utilizar para detectar la presencia o ausencia de nucleótidos variantes en una o más posiciones en un gen. En general, la detección de una variación alélica requiere una técnica de discriminación de la mutación, opcionalmente una reacción de amplificación (tal como una basada en una reacción en cadena de la polimerasa) y opcionalmente un sistema de generación de señales. En la técnica se puede acceder a una multitud de técnicas de detección de mutaciones y estas se pueden utilizar combinadas con un sistema de generación de señales, pudiéndose acceder a muchos de ellos en la técnica. Muchos métodos para la detección de variaciones alélicas han sido analizados por Nollau *et al.*, *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1114-1120; Anderson SM. *Expert Rev Mol Diagn.*, 2011, 11, 635-642; Meyerson M. *et al.*, *Nat Rev Genet.*, 2010, 11, 685-696; y en libros de texto normales, por ejemplo, "Laboratory Protocols for Mutation Detection", ed. Por U. Landegren, Oxford University Press, 1996 y "PCR", 2.ª edición por Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.  
35  
40

Tal y como se ha señalado anteriormente, la determinación de la presencia o ausencia de una varianza particular o pluralidad de varianzas en el gen ER $\alpha$  en un paciente con cáncer se puede realizar de muchas maneras. Tales pruebas se realizan normalmente utilizando ADN o ARN extraído de muestras biológicas, p. ej., biopsias tisulares, orina, heces, esputo, sangre, células, raspados tisulares, aspirados de mama u otros materiales celulares y se pueden realizar mediante varios métodos que incluyen, sin carácter limitante, la PCR, hibridación con sondas específicas del alelo, detección de la mutación enzimática, escisión química de emparejamientos erróneos, espectrometría de masas o secuenciación de ADN, que incluye la minisequenciación.  
45  
50

Las técnicas de detección de mutaciones adecuadas incluyen el sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMS<sup>TM</sup>), extensión lineal del sistema de mutación refractaria a la amplificación (ALEX<sup>TM</sup>), sistema de cebado oligonucleotídico competitivo (COPS, por sus siglas en inglés), Taqman, Balizas Moleculares, polimorfismo de la longitud de un fragmento de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) y técnicas de PCR basada en un sitio de restricción y de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés).  
55

En realizaciones particulares, el método empleado para determinar el nucleótido o los nucleótidos dentro de un gen biomarcador se selecciona entre: amplificación específica del alelo (PCR específica del alelo), tal como el sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMS), secuenciación, ensayo de discriminación alélica, hibridación, polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) o ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA, por sus siglas en inglés).  
60

En realizaciones particulares, la hibridación con sondas específicas del alelo se puede realizar mediante: (1) oligonucleótidos específicos del alelo unidos a una fase sólida (p. ej., membranas de vidrio, silicio, nailon) con la  
65

- muestra marcada en solución, por ejemplo, como en muchas aplicaciones de micromatrices de ADN; o (2) muestra unida (a menudo ADN clonado o ADN amplificado por PCR) y oligonucleótidos marcados en solución (ya sean específicos del alelo o cortos de manera que permitan la secuenciación por hibridación). Las pruebas diagnósticas pueden conllevar un grupo de varianzas, a menudo en un soporte sólido, lo que hace posible la determinación simultánea de más de una varianza. Tales sondas de hibridación son muy conocidas en la técnica (remítase a, p. ej., Green Sambrook, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4.ª edición, vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.) y pueden cubrir dos o más sitios de varianza.
- Por lo tanto, en una realización, la detección de la presencia o ausencia de al menos una mutación se refiere a la puesta en contacto del ácido nucleico de ER $\alpha$  que contiene un sitio de mutación putativo con al menos una sonda de ácido nucleico. Preferentemente, la sonda se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que incluye un sitio de varianza y que contiene bases nucleotídicas complementarias en el sitio de varianza con condiciones de hibridación selectivas. La hibridación se puede detectar con una marca detectable utilizando marcas conocidas por el experto en la técnica. Tales marcas incluyen, sin carácter limitante, marcas radioactivas, fluorescentes, enzimáticas y tintes.
- En otra realización, la detección de la presencia o ausencia de al menos una mutación se refiere a la puesta en contacto de un ácido nucleico de ER $\alpha$  que contiene un sitio de mutación putativo con al menos un cebador de ácido nucleico. Preferentemente, el cebador se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que incluye un sitio de varianza y que contiene bases nucleotídicas complementarias en el sitio de varianza con condiciones de hibridación selectivas.
- Los oligonucleótidos utilizados como observadores para la amplificación específica pueden portar la base nucleotídica complementaria a la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial; remítase a, p. ej., Gibbs *et al.*, 1989. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2437-248) o al final del extremo 3' de un cebador cuando, en condiciones apropiadas, un emparejamiento erróneo puede evitar o reducir la extensión de la polimerasa (remítase a, p. ej., Prossner, 1993, *Tibtech*, **11** 238).
- En otra realización más, la detección de la presencia o ausencia de al menos una mutación comprende secuenciar al menos una secuencia de ácido nucleico y comparar la secuencia obtenida con la secuencia de ácido nucleico natural conocida.
- Como alternativa, la presencia o ausencia de al menos una mutación comprende la determinación por espectrometría de masas de al menos una secuencia de ácido nucleico.
- En una realización, la detección de la presencia o ausencia de al menos una varianza de ácido nucleico comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplifica la secuencia de ácido nucleico diana que contiene la varianza hipotética y se determina la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado. La determinación de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado comprende secuenciar al menos un segmento de ácido nucleico. Como alternativa, los productos de la amplificación se pueden analizar utilizando cualquier método capaz de separar los productos de amplificación de acuerdo con su tamaño, que incluye la electroforesis en gel manual y automática y similares.
- Las mutaciones en el ácido nucleico genómico se detectan convenientemente mediante técnicas basadas en el cambio de la movilidad en fragmentos de ácido nucleico amplificados. Por ejemplo, Chen *et al.*, *Anal Biochem* 1996, **239**, 61-9, describen la detección de mutaciones de una única base mediante un ensayo de cambio de la movilidad competitivo. Además, los ensayos basados en la técnica de Marcelino *et al.*, *BioTechniques* 1999, **26**, 1134-1148 están comercializados.
- En un ejemplo particular, el análisis heterobicatenario capilar se puede utilizar para detectar la presencia de mutaciones en función del cambio de la movilidad de ácidos nucleicos bicatenarios en sistemas capilares como resultado de la presencia de emparejamientos erróneos.
- La generación de ácidos nucleicos para el análisis a partir de muestras requiere generalmente la amplificación del ácido nucleico. Muchos métodos de amplificación se basan en una reacción en cadena enzimática (tal como una reacción en cadena de la polimerasa, una reacción en cadena de la ligasa o una replicación de la secuencia autosuficiente) o a partir de la replicación de todo el vector en el que se ha clonado, o de parte de él. Preferentemente, la amplificación de acuerdo con la invención es una amplificación exponencial, tal como lo muestra, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa.
- En la bibliografía se han descrito muchos métodos de amplificación de la diana y de la señal, por ejemplo, se pueden consultar revisiones generales de estos métodos en Landegren, U. *et al.*, *Science*, 1988 **242**, 229-237 y Lewis, R., *Genetic Engineering News* 1990, **10**, 54-55. Estos métodos de amplificación se pueden utilizar en los métodos de la presente invención e incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR *in situ*, reacción de amplificación de la ligasa (LAR), hibridación de la ligasa, replicasa de bacteriófago Q $\beta$ , sistemas de

amplificación basados en la transcripción (TAS), amplificación genómica con secuenciación del transcrito (GAWTS), amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) e hibridación *in situ*. Se pueden preparar cebadores adecuados para su uso en varias técnicas de amplificación de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

5

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) PCR es un método de amplificación de ácidos nucleicos descrito entre otros en las patentes de EE. UU. N.ºs 4.683.195 y 4.683.202. La PCR consiste en ciclos repetidos de reacciones de extensión con un cebador generadas con la ADN polimerasa. El ADN diana se desnatura térmicamente y se hibrida en dos oligonucleótidos en los extremos de la secuencia diana en hebras opuestas de ADN. Estos oligonucleótidos se convierten en los cebadores para utilizarlos con la ADN polimerasa. El ADN se copia mediante la extensión del cebador para generar una segunda copia de ambas hebras. Repitiendo el ciclo de desnaturación térmica, hibridación y extensión del cebador, se puede amplificar el ADN diana 1 millón de veces o más en aproximadamente dos-cuatro horas. La PCR es una herramienta de la biología molecular, que se debe utilizar junto con una técnica de detección para determinar los resultados de la amplificación. Una ventaja de la PCR es que incrementa la sensibilidad al amplificar la cantidad de ADN diana entre 1 millón y 1 billón de veces en aproximadamente 4 horas. La PCR se puede utilizar para amplificar cualquier ácido nucleico conocido en un contexto de diagnóstico (Mok *et al.*, *Gynaecologic Oncology*, 1994, 52: 247-252).

10

15

Una técnica de amplificación específica del alelo tal como el sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMST™ (Newton *et al.*, *Nucleic Acid Res*, 1989, 17, 2503-2516) también se puede utilizar para detectar mutaciones de una única base. Con las condiciones de amplificación de PCR apropiadas es suficiente un emparejamiento erróneo de una única base ubicado en el extremo 3' del cebador para la amplificación preferente del alelo perfectamente emparejado (Newton *et al.*, 1989, *supra*), que permite la discriminación entre especies sumamente relacionadas. El fundamento de un sistema de amplificación que utiliza los cebadores descritos anteriormente es que los oligonucleótidos con un residuo 3' emparejado erróneamente no actuarán como cebadores con las condiciones de PCR apropiadas. Este sistema de amplificación permite el genotipado únicamente inspeccionando mezclas de reacción después de una electroforesis en gel de agarosa.

20

25

El análisis de los productos de amplificación se puede realizar utilizando cualquier método que sea capaz de separar los productos de la amplificación de acuerdo con su tamaño, que incluye la electroforesis en gel manual y automática, la espectrometría de masas y similares.

30

Los métodos de aislamiento, amplificación y análisis de ácidos nucleicos son habituales para el experto en la técnica y se pueden consultar ejemplos de protocolos, por ejemplo, en Green & Sambrook, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012, 4.ª edición, vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Una fuente particularmente útil de protocolos para los métodos utilizados en la amplificación por PCR es *PCR (Basics: From Background to Bench)* de M.J. McPherson, S.G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 1.ª edición (15 de octubre de 2000), ISBN: 0387916008.

35

La presente invención también proporciona kits predictivos y de diagnóstico que comprenden cebadores degenerados para amplificar un ácido nucleico diana en el gen ER $\alpha$  e instrucciones que comprenden: el protocolo de la amplificación y el análisis de los resultados. Como alternativa, el kit puede también comprender tampones, enzimas y recipientes para realizar la amplificación y el análisis de los productos de la amplificación. El kit también puede ser un componente de un kit de cribado o de diagnóstico que comprenda otras herramientas tales como micromatrices de ADN u otros soportes. Preferentemente, el kit también proporciona uno o más moldes de control, tales como ácidos nucleicos aislados a partir de una muestra de tejido normal y/o una serie de muestras que representan diferentes varianzas en los genes de referencia.

40

45

En una realización, el kit proporciona dos o más parejas de cebadores, donde cada par es capaz de amplificar una región diferente del gen (ER $\alpha$ ) de referencia (cada región un sitio de varianza potencial) y de esta manera proporciona un kit para el análisis de la expresión de varias varianzas génicas en una muestra biológica en una reacción o varias reacciones paralelas.

50

Los cebadores de los kits podrán estar marcados, por ejemplo, marcados fluorescentemente para facilitar la detección de los productos de la amplificación y, en consecuencia, el análisis de las varianzas del ácido nucleico. El kit también puede permitir que se detecte más de una varianza en un análisis. Por lo tanto, un kit combinado comprenderá cebadores capaces de amplificar diferentes segmentos del gen de referencia. Los cebadores pueden estar marcados de manera diferencial, por ejemplo, utilizando diferentes marcas fluorescentes, de modo que se diferencien las varianzas.

55

60

Tal y como se utilizan en la presente, los términos "eficaz" y "eficacia" incluyen tanto la eficacia farmacológica como la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del tratamiento para obtener el efecto biológico deseado en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, del órgano y/o del organismo (a menudo denominados efectos secundarios) que son consecuencia de la administración del tratamiento. La expresión "menos eficaz" se refiere a que el tratamiento da como resultado un nivel significativamente más bajo desde un punto de vista terapéutico de la

65

eficacia farmacológica y/o un nivel superior desde un punto de vista terapéutico de los efectos fisiológicos adversos.

5 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este para tratar a un paciente con cáncer en el cual se ha identificado que sus células tumorales poseen un gen ER $\alpha$  mutado. En una realización, el compuesto de Fórmula (I) es el Ejemplo 1.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este para tratar diferentes tipos de cáncer en los cuales se ha identificado que existen células tumorales que contienen un gen ER $\alpha$  mutado. En una realización, el compuesto de Fórmula (I) es el Ejemplo 1.

15 En otras realizaciones adicionales, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) para su uso en la prevención y el tratamiento de un cáncer en el cual se ha identificado que existen células tumorales que contienen un gen ER $\alpha$  mutado. En una realización, el compuesto de Fórmula (I) es el Ejemplo 1.

20 Para todos los aspectos anteriores, las formas mutadas de ER $\alpha$  determinadas/identificadas se encuentran en todas las posiciones a lo largo del gen.

Para todos los aspectos anteriores, en los que se utilizan tumores tales como el cáncer de mama como ejemplo, las formas mutadas particulares de ER $\alpha$  determinadas/identificadas son las que se encuentran en las posiciones Ser463Pro, Val543Glu, Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn y Asp538Gly.

25 Breve Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma A del Ejemplo 7.

30 La Figura 2 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma B del Ejemplo 1.

La Figura 3 muestra un termograma de CDB para la Forma B del Ejemplo 1.

La Figura 4 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma A del Ejemplo 1.

35 La Figura 5 muestra un termograma de CDB para la Forma A del Ejemplo 1.

La Figura 6 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma C del Ejemplo 1.

40 La Figura 7 muestra un termograma de CDB para la Forma C del Ejemplo 1.

La Figura 8 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo para el Ejemplo 11.

La Figura 9 muestra una curva de CDB para el Ejemplo 11.

45 La Figura 10 muestra los resultados de un estudio de xenoinjerto en MCF-7 con el Ejemplo 1 y AZD2014.

Las Figuras 11 y 12 muestran los resultados de un estudio sobre la eficacia de un xenoinjerto de HCC1428 carente de estrógeno durante un periodo prolongado (LTED) con el Ejemplo 1.

50 Ejemplos

La invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes Ejemplos en los cuales, generalmente:

55 (i) Las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, es decir, en el rango de 17 a 25 °C y en atmósfera de un gas inerte tal como nitrógeno, a no ser que se indique lo contrario.

(ii) Las evaporaciones se llevaron a cabo mediante evaporación rotatoria o utilizando un equipo Genevac o un evaporador Biotage v10 al vacío y los procedimientos de tratamiento de las reacciones se llevaron a cabo después de eliminar los sólidos residuales por filtración.

60 (iii) Las purificaciones mediante cromatografía flash se llevaron a cabo en un instrumento automatizado Teledyne Isco CombiFlash® Rf o Teledyne Isco CombiFlash® Companion® utilizando columnas de sílice RediSep Rf Gold™ preempaquetadas (20-40  $\mu$ m, partículas esféricas), cartuchos de GraceResolv™ (sílice Davisil®) o cartuchos de Silicycle (40 - 63  $\mu$ m).

65 (iv) La cromatografía preparativa se llevó a cabo en un instrumento de HPLC prep. Gilson con recolección UV.

- (v) La cromatografía preparativa quiral se llevó a cabo en un instrumento Gilson con recolección UV (inyector 233 / recolector de fracciones, bombas 333 y 334, detector UV 155) o un instrumento Varian Prep Star (2 x bombas SD1, detector UV 325, recolector de fracciones 701) con una bomba que opera con un inyector Gilson 305.
- 5 (vi) Los rendimientos, cuando estén presentes, no son necesariamente los máximos que se pueden obtener.
- (vii) En general, las estructuras de los productos finales de Fórmula (I) se confirmaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN); los valores de los desplazamientos químicos de la RMN se midieron en la escala delta [los espectros de resonancia magnética de protón se determinaron utilizando un instrumento Bruker Avance 500 (500 MHz) o Bruker Avance 400 (400 MHz)]; las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, a menos que se indique de otra manera; se han utilizado las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuatriplete; m, multiplete; dd, doble doblete; ddd, doble doblete; dt, doble triplete; sa, singlete ancho.
- 10 (viii) En general, los productos finales de Fórmula (I) también se caracterizaron mediante espectroscopía de masas tras una cromatografía líquida (LCMS o UPLC); la UPLC se llevó a cabo utilizando un instrumento UPLC Waters equipado con un espectrómetro de masas SQ Waters (temp. de la columna 40, UV = 220-300 nm, espec. masas = ESI con intercambio positivo/negativo) con una tasa de flujo de 1 mL/min utilizando un sistema de disolventes constituido por desde un 97% de A + un 3% de B hasta un 3% de A frente a un 97% de B durante 1.50 min (tiempo total del análisis con equilibración de vuelta a las condiciones de partida, etc.: 1.70 min), donde A = ácido fórmico al 0.1% en agua (para casos ácidos) o amoniaco al 0.1% en agua (para casos básicos) y B = acetonitrilo. Para el análisis de ácidos la columna utilizada fue Waters Acquity HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$  2.1x50 mm, para el análisis de bases la columna utilizada fue Waters Acquity BEH 1.7  $\mu\text{m}$  2.1x50 mm; la LCMS se llevó a cabo utilizando un instrumento Waters Alliance HT (2795) equipado con un espectrómetro de masas Waters ZQ ESCi y una columna Phenomenex Gemini-NX (50x2.1 mm 5  $\mu\text{m}$ ) con una tasa de flujo de 1.1 mL/min desde un 95% de A hasta un 95% de B durante 4 min y manteniendo estas condiciones durante 0.5 min. El modificador se mantuvo con una proporción constante de un 5% de C (acetonitrilo:ácido fórmico al 0.1% en agua 50:50) o D (acetonitrilo:hidróxido de amonio al 0.1% en agua 50:50 (0.88 SG)) dependiendo de si se trataba de un método ácido o básico.
- 15 (ix) La purificación por intercambio iónico se llevó a cabo generalmente utilizando un cartucho SCX-2 (sílice funcionalizada con ácido propilsulfónico de Biotage, fabricada utilizando un silano trifuncional, sin protección de los extremos).
- 20 (x) La pureza de los intermedios se evaluó mediante análisis por cromatografía de capa fina, espectro de masas, HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y/o NMR.
- 25 (xi) Para el análisis de DRXP del Ejemplo 7, las muestras se colocaron sobre obleas de silicio con ruido de fondo cero y se analizaron utilizando el difractómetro PANalytical CubiX Pro ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). Las muestras se centrifugaron para mejorar la estadística del recuento. Los datos se recolectaron en una geometría de reflexión en una configuración theta - 2theta a lo largo del rango de barrido desde 2° hasta 40° 2-theta con una exposición de 25 segundos por cada incremento de 0.025067°. Los rayos X se generaron con un tubo de cobre de foco fino largo que operaba a 45 kV y 40 mA. Los expertos en la técnica de la difracción de rayos X en polvo se darán cuenta de que la intensidad relativa de los picos se puede ver afectada, por ejemplo, por granos con un tamaño superior a 30 micras y relaciones entre las dimensiones no unitarias, lo cual puede afectar al análisis de las muestras. El experto también se dará cuenta de que la posición de las reflexiones se puede ver afectada por la altura exacta a la cual se coloca la muestra en el difractómetro y la calibración del cero del difractómetro. Puede que también tenga un pequeño efecto la planicidad de la superficie de la muestra. Por consiguiente, los datos de los patrones de difracción presentados no se deben considerar como valores absolutos.
- 30 (xii) Para el análisis de DRXP del Ejemplo 1, el difractograma de rayos X en polvo se determinó colocando una muestra del material cristalino sobre un soporte para obleas de silicio monocristalino (SSC) Panalytical y esparciendo la muestra en una capa fina con la ayuda de un portaobjetos de microscopio. La muestra se centrifugó a 30 revoluciones por minuto (para mejorar la estadística del recuento) y se irradió con rayos X generados con un tubo de cobre de foco fino largo que operaba a 45 kV y 40 mA con una longitud de onda de 1.5418 angstroms. El haz de rayos X se hizo pasar a través de una rendija Soller de 0.04 rad, a continuación a través de una rendija de divergencia variable automática fijada a 20 mm y finalmente a través de una rejilla para el haz de 20 mm. La radiación reflejada se dirigió a través de una rendija antidispersión de 20 mm y una rendija Soller de 0.04 rad. La muestra se expuso durante 1.905 segundos por cada incremento de 0.0025067° 2-theta (modo de barrido continuo) en el rango desde 2 grados hasta 40 grados 2-theta en modo theta-theta. El tiempo transcurrido fue de 3 minutos y 36 segundos. El instrumento estaba dotado de un detector X-Celerator. El control y el registro de los datos se realizaron utilizando una estación de trabajo Dell Pentium 4HT que operaba con el software X'Pert Industry.
- 35 (xiii) Calorimetría diferencial de barrido: instrumento analítico: TA Instruments Q1000 DSC. Normalmente, se calentaron menos de 5 mg de material contenido en una cápsula de aluminio estándar con una tapa en el rango
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

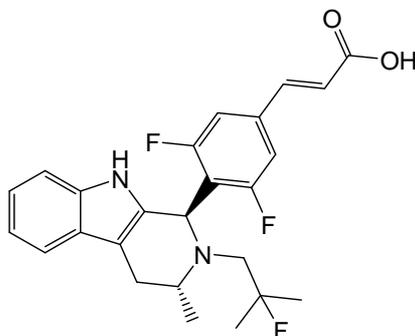
de temperaturas desde 25 °C hasta 300°C con una tasa de calentamiento constante de 10 °C por minuto. Se empleó un gas de purga con nitrógeno (tasa de flujo de 50 mL por minuto).

5 (xiv) Análisis termogravimétrico: instrumento analítico: TA Instruments Q5000 TGA. Normalmente, se colocaron menos de 10 mg de material en una cápsula de platino de 100 µL y se calentaron en el rango de temperaturas desde 30 °C hasta 150°C con una tasa de calentamiento constante de 10 °C por minuto.

(xv) Se utilizaron las siguientes abreviaturas:

10	ac.	acuoso/a
	CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
	Conc.	concentrado
15	DCM	diclorometano
	DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
20	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	DSC	calorimetría diferencial de barrido
	EtOH	etanol
25	EtOAc	acetato de etilo
	IPA/iPrOH	alcohol isopropílico
30	MeCN	acetonitrilo
	MTBE	éter <i>tert</i> -butil metílico
	TA/temp. amb.	temperatura ambiente
35	sat.	saturado/a
	sol.	solución
40	THF	tetrahidrofurano
	TFA	ácido trifluoroacético
45	TGA	análisis termogravimétrico

**Ejemplo 1: ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico**



50

Los siguientes procesos se deben llevar a cabo en una atmósfera de nitrógeno en ausencia de luz, ya que se puede formar un producto de degradación [(*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ilo-1-il)fenil)acrilato] por acción de la luz.

En un recipiente fijo de 5 L, se introdujo (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (350 g, 766.69 mmol). Se añadió alcohol isopropílico (2.80 L) al recipiente. Se añadió hidróxido de sodio (5 M, 460 mL, 2.30 mol) en una porción y la mezcla se agitó a 21 °C durante 16 h. La solución oscura se tamizó a través de un filtro para eliminar las partículas. El filtrado se volvió a introducir en el recipiente del reactor. Tanto el filtro como recipiente de recolección del filtrado se lavaron con isopropanol (700 mL) y los lavados se añadieron al recipiente del reactor. La mezcla de reacción se agitó y se añadió agua (1.75 L). Se introdujo ácido clorhídrico concentrado (37% p/p, 165 mL, 1.92 mol) en el recipiente. Se añadió más ácido clorhídrico (21.5 mL) al recipiente para ajustar el pH entre 4.0 y 4.5. La solución se calentó hasta 50 °C. Se añadió agua (1.92 L) al recipiente durante 1 hora, manteniendo la temperatura interna entre 50 y 53 °C. La temperatura de la camisa se incrementó hasta 70 °C para mantener la temperatura del reactor en este rango durante la adición. A los 10 minutos después de completar la adición de agua, se formaron núcleos de cristalización en la mezcla y esta empezó a cristalizar. La mezcla se mantuvo a 50-52 °C durante 1.5 horas (temperatura fija de la camisa: 58 °C). La suspensión amarilla resultante se enfrió hasta 5 °C (temperatura de la camisa) durante 6 horas. La suspensión se mantuvo a 5 °C (temperatura de la camisa) durante 11 h. El sólido amarillo resultante se aisló por filtración. La masa húmeda retenida sobre el filtro se esparció con una espátula para evitar la formación de grietas en dicha masa. El recipiente se lavó con agua (1.05 L). Los lavados se utilizaron para lavar la masa húmeda retenida sobre el filtro. La masa húmeda retenida sobre el filtro se secó al aire y a continuación se secó al vacío hasta obtener un peso constante durante 4 días (temperatura del horno = 30 °C). De este modo, se aisló el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato como un sólido cristalino amarillo, la "Forma B" (319.45 g, 94%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) 1.05 (3H, d), 1.08 – 1.28 (6H, m), 2.35 (1H, dd), 2.58 (1H, dd), 2.8 – 2.97 (2H, m), 3.47 – 3.57 (1H, m), 5.22 (1H, s), 6.67 (1H, d), 6.91 – 7.06 (2H, m), 7.19 (1H, d), 7.41 (1H, d), 7.46 (2H, d), 7.54 (1H, d), 10.58 (1H, s), 12.62 (1H, s).

A continuación se indica un método alternativo para sintetizar el Ejemplo 1, que da como resultado la formación de un material cristalino que se corresponde con la Forma B:

Los siguientes procesos se deben llevar a cabo en una atmósfera de nitrógeno en ausencia de luz, ya que se puede formar un producto de degradación (como el descrito anteriormente) por acción de la luz.

Se agitó (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (50.0 g, 109.53 mmol) en alcohol isopropílico (450 mL). Se añadió hidróxido de sodio (68.34 g, 65.72 mL, 328.58 mmol) en una porción y la mezcla se agitó a 20 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (250 mL), se ajustó el pH hasta un pH de 4 con ácido clorhídrico conc. (27.28 mL, 317.63 mmol) y la mezcla se calentó hasta 50 °C. Se añadió más agua (225 mL) durante 30 minutos, manteniendo la temperatura por encima de 45 °C. Durante la adición, el material empezó a cristalizar. La mezcla se enfrió desde 50 °C hasta 5 °C en 5 horas y a continuación la suspensión se mantuvo a 0 °C durante 11 horas más. El sólido amarillo se aisló por filtración. La masa húmeda retenida sobre el filtro se lavó con agua (100 mL), se secó sobre el filtro durante 20 minutos más y a continuación se secó en un horno de vacío durante 16 horas hasta obtener un peso constante (30 °C, con un pequeño flujo de aire) para obtener el compuesto del título (46.52 g) como un sólido cristalino (Forma B).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) 1.02 – 1.09 (3H, m), 1.17 (6H, dd), 2.37 (1H, dd), 2.59 (1H, dd), 2.8 – 2.98 (2H, m), 3.47 – 3.58 (1H, m), 5.24 (1H, s), 6.68 (1H, d), 6.9 – 7.06 (2H, m), 7.20 (1H, d), 7.38 – 7.51 (3H, m), 7.55 (1H, d), 10.59 (1H, s), 12.60 (1H, a).

La Forma cristalina B también se puede aislar a partir de mezclas de etanol/agua y mezclas de etanol/MTBE.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona la Forma cristalina B del Ejemplo 1, aislada a partir de una mezcla de isopropanol/agua.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para aislar la Forma cristalina B del Ejemplo 1 que comprende la hidrólisis de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo en alcohol isopropílico y base, seguida de la acidificación y el aislamiento del producto cristalino a partir del isopropanol acuoso.

La Forma B del Ejemplo 1 se caracteriza por que proporciona al menos uno de los siguientes valores 2θ medidos utilizando radiación CuKα: 8.4 y 10.9. La Forma B del Ejemplo 1 se caracteriza por que proporciona un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Figura 2. En la Tabla A se muestran diez picos de la difracción de rayos X en polvo:

**Tabla A****Diez picos de la difracción de rayos X en polvo para la Forma B del Ejemplo 1**

5

Ángulo Theta (2θ)	% de intensidad
8.4	100
10.9	88.5
18.3	84.5
24.0	78.5
14.0	66.4
19.0	55.9
14.4	54.3
13.0	45
15.3	44.7
20.6	44.2

El análisis por CDB para la Forma B del Ejemplo 1 muestra que este es un sólido con punto de fusión elevado, con una endoterma que presenta el inicio de la fusión a 188.6 °C (Figura 3). El Ejemplo 1 presenta degradación en la masa fundida, que puede conllevar una variación en el inicio de la fusión, por lo tanto, el valor de 188.6 °C no se debe considerar como absoluto.

10

También se han observado dos formas solvatadas del Ejemplo 1.

15

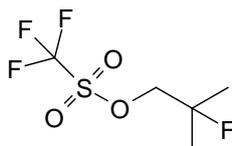
La Forma A es un monosolvato de éter *tert*-butil metílico. En la Figura 4 se muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo. El ATG presenta una pérdida de peso asociada de un 14.7% p/p entre 55 y 150 °C (Figura 5). Se calcula que una pérdida teórica para un monosolvato de éter *tert*-butil metílico ha de ser de un 16.6%.

20

La Forma C es monosolvato de acetona, cuyo patrón de difracción de rayos X en polvo se muestra en la Figura 6. El ATG presenta una pérdida de peso asociada de un 10.0% p/p entre 50 y 150 °C (Figura 7). Se calcula que una pérdida teórica para un monosolvato de acetona ha de ser de un 11.0%.

El (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

25

**Preparación del trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo**

30

En un recipiente de 20 L, se introdujo 2-fluoro-2-metil-propan-1-ol (1000 g, 10.86 mol) con una atmósfera de nitrógeno. Se añadió DCM (8.5 L) al recipiente. La mezcla se agitó y se enfrió hasta 1 °C. Se añadió 2,6-lutidina (1395 g, 13.02 mol) a la mezcla. Se añadió una solución de anhídrido trifluorometanosulfónico (3220 g, 11.41 mol) en DCM (1 L) durante 1 hora, manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 5 °C (la temperatura fija de la camisa se redujo hasta -20 °C durante la adición). El recipiente de adición y las líneas se lavaron con DCM (0.5 L) y los lavados se añadieron al recipiente en una porción. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 hora y se obtuvo una solución de color rojo.

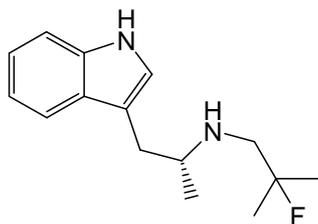
35

40

Se añadió una solución de ácido clorhídrico concentrado (1.23 L, al 37% p/p, 16.3 mol) a agua (7 L). La solución diluida de ácido clorhídrico se añadió a la solución de color rojo y la mezcla agitada se calentó hasta 25 °C. Se permitió que se separaran las fases y se descartó la fase acuosa superior. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 5 L). La solución orgánica se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color rojo. El aceite de color rojo se purificó mediante destilación utilizando un evaporador de película agitada (4.5 mbar, temperatura de la camisa: 50 °C, temperatura del condensador: 4 °C) para proporcionar el trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo (1.69 kg, 69%) como un aceite de color rojo pálido. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 27 °C) δ 1.40 (6H, d), 4.79 (2H, d).

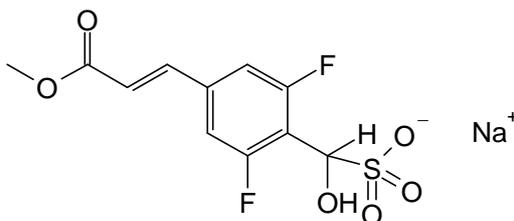
45

**Preparación de (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-*il*)propan-2-*il*)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina**



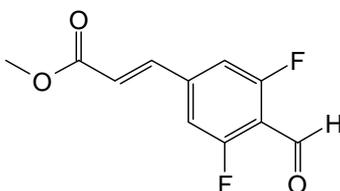
Se añadió (2*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina (3.81 kg, 21.21 mol) a un recipiente de 100 L con camisa y revestido con vidrio en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió 1,4-dioxano (23 L) y se encendió el agitador. Se añadió diisopropiletilamina (5.55 L, 31.82 mol) a la suspensión agitada y a continuación se añadió trifluorometanosulfonato de (2-fluoro-2-metilpropilo) (5.55 kg, 23.77 mol). Se añadió 1,4-dioxano (4 L) al recipiente y la mezcla se calentó hasta 75 °C. Se continuó calentando durante 24 horas antes de enfriar la mezcla hasta 25 °C. Se añadió agua (30.5 L) al recipiente y a continuación tolueno (30.5 L). Después de 40 minutos, se detuvo el agitador y se permitió que se separaran las fases. Se retiró la fase acuosa y se añadió agua (30.5 L) a la solución orgánica. La mezcla se agitó durante 15 minutos antes de permitir que se separaran las fases. La fase acuosa se retiró del recipiente. La solución orgánica se concentró mediante destilación al vacío (temperatura de la camisa: 65 °C, 110 mbar de presión) hasta que se eliminaron aproximadamente 27 L de destilado. La solución remanente en el recipiente se enfrió para proporcionar (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina como una solución en tolueno (al 33% p/p) (15.4 kg, 97%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) 0.98 (3H, d), 1.26 (3H, d), 1.30 (3H, d), 2.57 – 2.75 (3H, m), 2.81 (1H, dd), 2.84 – 2.92 (1H, m), 6.97 (1H, t), 7.06 (1H, t), 7.11 – 7.22 (1H, multiplete que se solapa con las señales del tolueno), 7.34 (1H, d), 7.52 (1H, d), 10.80 (1H, s).

#### **Preparación de {2,6-difluoro-4-[(1*E*)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-il]fenil}(hidroxi)metanosulfonato de sodio**



En un recipiente de 20 L, se introdujeron 2,6-difluoro-4-bromobenzaldehído (1000 g, 4.39 mol) y dicloruro de 1,1-bis(di-*tert*-butilfosfino)ferrocenopaladio (57.2 g, 87.76 mmol). Se añadió cloruro de tetra-*N*-butilamonio (122 g, 438.97 mmol) y a continuación dimetilacetamida (5 L). El recipiente se purgó con una corriente de nitrógeno gaseoso. Se añadió diisopropiletilamina (1.5 L, 8.78 mol) al recipiente y a continuación se añadió acrilato de metilo (0.435 L, 4.82 mol). La mezcla se agitó y se calentó hasta 60 °C. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 20 horas. Se añadió acetato de etilo (10 L) a la mezcla y se dejó de calentar. Se añadió agua (5 L) al recipiente. La mezcla agitada se enfrió hasta 25 °C y se continuó agitando durante 10 minutos. Se detuvo la agitación y se permitió que se separaran las fases. La fase acuosa se retiró y se descartó. La fase orgánica se lavó secuencialmente con ácido clorhídrico (2.2 M, 6 L) y agua (5 L). Se añadió el atrapador SPM32 de Phosphonics (1050 g, 1050 mol) al recipiente y la mezcla se agitó durante 3 días a 25 °C. El material sólido se eliminó por filtración. La masa húmeda retenida sobre el filtro se lavó con etanol (5 L) y los filtrados combinados se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido. El sólido se disolvió en etanol (9 L) y la solución se agitó en un recipiente de 20 L. La solución se calentó hasta 50 °C. Se añadió una solución de bisulfito de sodio (460 g, 4.42 mol) en agua (2.5 L) durante 30 minutos. Como resultado, se obtuvo una suspensión espesa, la cual se agitó durante 4 horas a 50 °C. La suspensión se enfrió hasta 20 °C durante 2 horas. El sólido se aisló por filtración y el recipiente y la masa húmeda retenida sobre el filtro se lavaron con MTBE (2 x 3 L). El sólido resultante se secó al vacío para proporcionar {2,6-difluoro-4-[(1*E*)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-il]fenil}(hidroxi)metanosulfonato de sodio (1035 g, 71%) como un sólido de color marrón claro. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) δ 3.73 (3H, s), 5.32 (1H, d), 5.94 (1H, d), 6.76 (1H, d), 7.40 (2H, d), 7.60 (1H, d).

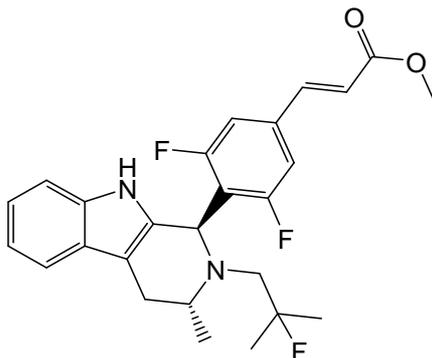
#### **Preparación de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo**



45

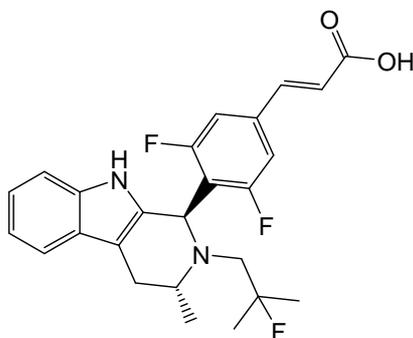
En una atmósfera de nitrógeno, se añadió {2,6-difluoro-4-[(1*E*)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-il]fenil}(hidroxi)metanosulfonato de sodio (1.211 kg, 3.52 mol) a un recipiente de 100 L y a continuación se añadió carbonato de potasio (0.974 kg, 7.05 mol). Se añadió agua (9.1 L) y se encendió el agitador. Se añadió acetato de etilo (9.1 L). La mezcla se agitó a 25 °C durante 5 horas. Se detuvo el agitador y se permitió que la mezcla reposara durante 14 horas a 25 °C. La fase acuosa inferior se retiró y se descartó. La fase orgánica superior se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido de color marrón pálido. El sólido se secó al vacío para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo como un sólido de color marrón (608 g, 76%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) δ 3.77 (3H, s), 6.94 (1H, d), 7.66 (1H, d), 7.71 (2H, d), 10.20 (1H, s).

10 **Preparación de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo**



15 En una atmósfera de nitrógeno, se introdujeron (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (0.606 kg, 2.65 mol) y (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina (solución al 33% p/p en tolueno, 2.0 kg, 2.65 mol) en un recipiente de 20 L y a continuación se añadió tolueno (4.22 L). Se añadió ácido acético (304 mL, 5.31 mol) al recipiente. La mezcla se agitó y se calentó hasta 80 °C. La mezcla se agitó a 80 °C durante toda la noche antes de enfriarla hasta 20 °C. Se añadió una solución de carbonato de potasio (0.916 kg, 6.63 mol) en agua (3.3 L) a la mezcla. La mezcla se agitó durante 10 minutos antes de detener el agitador y se permitió que se separaran las fases. La fase acuosa se retiró y se descartó. Se introdujo agua (3.3 L) en el recipiente. La mezcla se agitó durante 10 minutos y a continuación se permitió que reposara durante 10 minutos. La fase acuosa inferior se retiró y se permitió que la fase orgánica reposara a temperatura ambiente durante toda la noche. El lote se calentó hasta 80 °C. Se añadió heptano (4.61 L) a la solución caliente durante 35 minutos. La mezcla agitada se mantuvo a aproximadamente 80 °C durante 1 hora. La mezcla se enfrió hasta 30 °C en 2 horas y durante este tiempo el producto cristalizó. La suspensión se agitó a 30 °C durante 2.5 horas. El sólido se aisló por filtración. Las paredes del recipiente del reactor se lavaron con heptano y los lavados se utilizaron para lavar la masa húmeda retenida sobre el filtro. El sólido se secó al vacío para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo como un sólido de color rosa (0.763 kg, 61%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 1.06 (3H, d), 1.13 (3H, d), 1.21 (3H, d), 2.35 (1H, dd), 2.58 (1H, dd), 2.8 – 2.98 (2H, m), 3.44 – 3.61 (1H, m), 3.74 (3H, s), 5.24 (1H, s), 6.80 (1H, d), 6.9 – 7.05 (2H, m), 7.19 (1H, d), 7.41 (1H, d), 7.50 (2H, d), 7.63 (1H, d), 10.58 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 457.

35 **Preparación alternativa del Ejemplo 1: ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico**

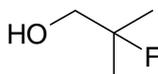


40 Se añadió hidróxido de sodio 7.5 M (32.9 mL, 247.10 mmol) a una solución de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (11.28 g, 24.71 mmol) en THF (143 mL) y metanol (71.4 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El pH de la fase acuosa se ajustó hasta ~6.5 mediante la adición de una solución de HCl 2 N y a continuación la solución

se extrajo con éter dietílico (3 x 150 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice, con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 20% de metanol en DCM, lo cual proporcionó un sólido de color amarillo. Un intento de lavarlo disgregándolo con acetona/heptano fracasó, debido a una solubilidad más elevada de lo esperado. Los disolventes se eliminaron para proporcionar un sólido de color amarillo, el cual se lavó disgregando en isohexano (50 mL) con unas gotas de éter dietílico, el sólido resultante se separó por filtración y se secó para obtener un producto crudo (11.14 g) como un polvo de color amarillo. El sólido se disolvió en etanol (100 mL) en atmósfera de nitrógeno y en la oscuridad. A continuación, la solución se evaporó a 5 mbar utilizando una bomba de vacío a 62 °C en la oscuridad. Este procedimiento se repitió dos veces y el vidrio amarillo resultante se raspó con una espátula hasta obtener un polvo fino, el cual se sometió a 5 mbar utilizando una bomba de vacío a 62 °C durante 60 min para proporcionar un polvo amarillo. A continuación, el polvo se dejó en un horno de vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a 62 °C y 300 mbar durante toda la noche para proporcionar el producto del título (9.77 g, 89%) como un sólido de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 1.07 - 1.16 (3H, m), 1.18 - 1.29 (6H, m), 2.39 (1H, dd), 2.62 (1H, dd), 2.92 (2H, dd), 3.56 (1H, d), 5.26 (1H, s), 6.70 (1H, d), 7.02 (2H, dd), 7.22 (1H, d), 7.47 (3H, dd), 7.58 (1H, d), 10.60 (1H, s), 12.60 (1H, s). m/z: ES+ (electronebulización+) [M+H]<sup>+</sup> 443.

El (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

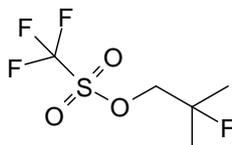
### 20 Preparación de 2-fluoro-2-metilpropan-1-ol



Se añadió hidruro de aluminio y litio (3.37 g, 88.56 mmol) en porciones durante 15 min a una solución enfriada de 2-fluoro-2-metilpropanoato de etilo (9.9 g, 73.80 mmol) en éter dietílico (184 mL) a 0 °C. La reacción se agitó durante 1 h y a continuación se añadieron secuencialmente agua (3.3 mL), seguida de una solución de NaOH al 15% (3.3 mL) y agua (6.7 mL). La suspensión se agitó durante 15 min, a continuación se filtró y el sólido se lavó con éter dietílico. El filtrado se evaporó para obtener 2-fluoro-2-metilpropan-1-ol (5.90 g, 87%) como un aceite incoloro.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) δ 1.37 (6H, d), 3.56 (2H, d), no se observó el OH.

### Preparación alternativa del trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo



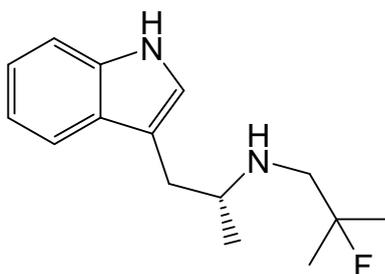
Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (12.06 mL, 71.24 mmol) seguido de 2,6-lutidina (11.42 mL, 81.42 mmol) a una solución de 2-fluoro-2-metilpropan-1-ol (6.25 g, 67.85 mmol) en DCM (146 mL) a -10 °C. La reacción se agitó durante 1 h y a continuación se lavó con HCl 2 N (2 x 100 mL) y una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 100 mL). A continuación, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para obtener el trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo (12.89 g, 85%) como un aceite de color rojo.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) δ 1.46 (6H, d), 4.41 (2H, d).

Este intermedio se podría purificar mediante destilación al vacío. El análisis por CDB indicó que el material tenía el potencial de emitir calor por sí mismo. Por motivos de seguridad en el proceso, quizás sea preferible utilizar un evaporador de película agitada o similar en lugar de una destilación del lote.

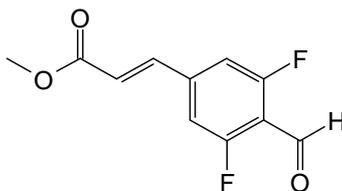
### Preparación alternativa de (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-*il*)propan-2-*il*)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina

50



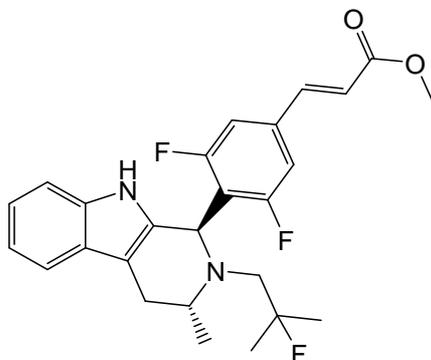
Se añadió trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo (8.04 g, 35.87 mmol) a una solución de (*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina (5.00 g, 28.70 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (7.44 mL, 43.04 mmol) en dioxano (50 mL). La reacción se calentó hasta 90 °C durante 3 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la reacción se diluyó con EtOAc (200 mL) y se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 100 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (150 mL) y a continuación las fases orgánicas combinadas se secaron con MgSO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución de un 100% de EtOAc. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina (6.49 g, 91%) como un aceite de color marrón. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) δ 1.14 (3H, d), 1.31 (3H, d), 1.37 (3H, d), 1.94 (1H, s), 2.63 - 2.87 (3H, m), 2.92 (1H, dd), 3.07 (1H, h), 7.07 (1H, d), 7.08 - 7.15 (1H, m), 7.16 - 7.24 (1H, m), 7.37 (1H, d), 7.62 (1H, d), 8.04 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 249.

#### 15 Preparación alternativa de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo



Se añadió DMA completamente desgasificada (100 mL) a 4-bromo-2,6-difluorobenzaldehído (9.99 g, 45.20 mmol) y acrilato de metilo (6.14 mL, 67.81 mmol), y después se añadieron tri-*o*-tolilfosfina (1.376 g, 4.52 mmol), acetato de paladio (II) (0.507 g, 2.26 mmol) y trietilamina (12.60 mL, 90.41 mmol). La reacción se agitó y se calentó hasta 80 °C durante 6 horas. La mezcla de reacción se enfrió, se filtró a través un lecho de celite y se lavó con metanol (50 mL). El producto crudo se preabsorbió sobre sílice y se purificó por cromatografía de succión eluyendo con un 0-10% de éter dietílico/diclorometano. Las fracciones que contenían el producto deseado se evaporaron y se lavaron disgregándolas con éter dietílico (50 mL) para proporcionar un sólido de color amarillo, el cual se lavó disgregándolo con agua (50 mL) y se secó con un vacío elevado a 50 °C para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (8.85 g, 87%) como un sólido de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 3.75 (3H, s), 6.93 (1H, d), 7.52 - 7.81 (3H, m), 10.18 (1H, s). No se observó el ión de la masa en LCMS.

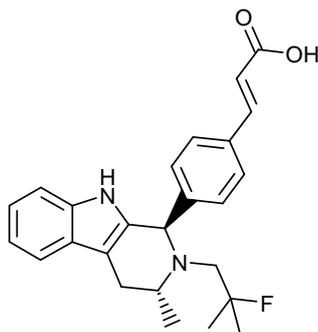
#### 30 Preparación alternativa de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo



Se añadió (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (6.58 g, 29.09 mmol) a una suspensión de (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina (6.02 g, 24.24 mmol) en tolueno (51.1 mL) y ácido acético (2.78 mL, 48.48 mmol). La reacción se calentó hasta 80 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna SCX-2. El producto deseado se

eluyó de la columna utilizando  $\text{NH}_3$  7 M/metanol y las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar un sólido de color marrón. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 30% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar el producto del título (7.52 g, 68.0%) como un sólido amarillo.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO, 100 °C)  $\delta$  1.10 (3H, d), 1.12 - 1.31 (6H, m), 2.28 - 2.72 (2H, m), 2.84 - 3.09 (2H, m), 3.52 - 3.69 (1H, m), 3.76 (3H, s), 5.30 (1H, s), 6.64 (1H, d), 6.9 - 7.11 (2H, m), 7.21 (1H, d), 7.32 (2H, d), 7.42 (1H, d), 7.58 (1H, d), 10.14 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 457.

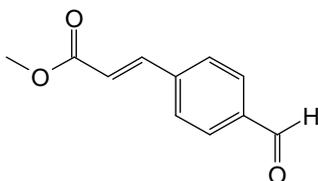
**Ejemplo 2: ácido (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilico**



Se añadió una solución de hidróxido de sodio 7.5 M (0.983 mL, 7.37 mmol) a una solución de (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (310 mg, 0.74 mmol) en metanol (5 mL). La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna SCX-2. Las fracciones que contenían el producto deseado se eluyeron de la columna utilizando  $\text{NH}_3$  7 M/metanol y las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar un sólido de color amarillo. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters SunFire, sílice de 5  $\mu$ , 50 mm de diámetro, 100 mm de longitud), utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (que contenía un 0.1% de ácido fórmico) y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad y a continuación se introdujeron en una columna SCX-2 y se eluyeron con amoníaco 7 N en metanol para proporcionar el producto del título (63.0 mg, 21.02%) como un sólido de color amarillo.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C)  $\delta$  1.06 (3H, d), 1.30 (3H, d), 1.47 (3H, d), 2.53 - 2.64 (2H, m), 2.79 (2H, s), 3.10 (1H, d), 5.08 (1H, s), 6.47 (1H, d), 6.98 (1H, t), 7.06 (1H, t), 7.19 - 7.37 (3H, m), 7.44 (1H, d), 7.56 (1H, d), 7.63 (2H, d), 10.81 (1H, s), 12.30 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 407.

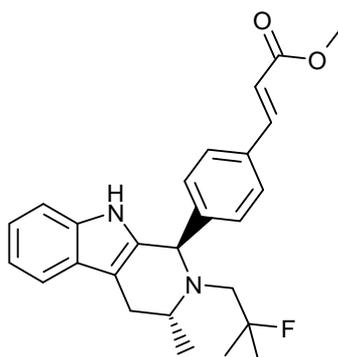
El (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

**Preparación de (E)-3-(4-formilfenil)acrilato de metilo**



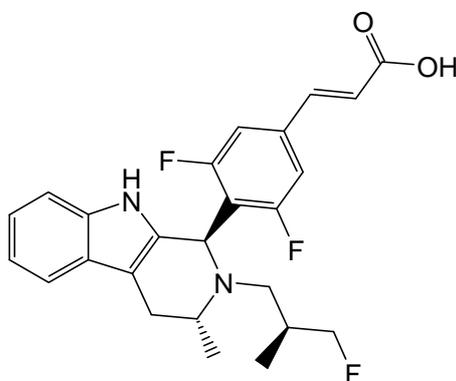
Se añadió DMA completamente desgasificada (300 mL) a 4-bromobenzaldehído (30 g, 162.15 mmol) y acrilato de metilo (20.94 g, 243.22 mmol), se trataron con tri-*o*-tolilfosfina (4.94 g, 16.21 mmol), acetato de paladio (II) (1.820 g, 8.11 mmol) y trietilamina (45.2 mL, 324.29 mmol) y se calentaron hasta 110 °C durante 16 horas. Al parecer la reacción se había completado después de que transcurriera este tiempo. La mezcla de reacción se vertió sobre agua (4 L) y el precipitado resultante se filtró y se secó. El sólido se cromatografió en sílice eluyendo con desde un 100% de heptano hasta un 30% de EtOAc en heptano. Las fracciones relevantes se combinaron y se evaporaron a sequedad para proporcionar un producto sólido de color amarillo, el cual se lavó disgregándolo con heptano, se filtró y se lavó con heptano frío. El sólido se secó para proporcionar (E)-3-(4-formilfenil)acrilato de metilo (25.6 g, 83%) como un producto cristalino de color amarillo.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C)  $\delta$  3.75 (3H, s), 6.79 (1H, d), 7.72 (1H, d), 7.93 (4H, s), 10.03 (1H, s). No se observó el ión de la masa en LCMS.

**Preparación de (E)-3-(4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo**



Se disolvieron (*R*)-*N*-(1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina (obtenida como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 1) (450 mg, 1.81 mmol) y (*E*)-metil 3-(4-formilfenil)acrilato de metilo (345 mg, 1.81 mmol) en tolueno (15 mL) y se añadieron ácido acético (5 mL) y tamices moleculares. La reacción se agitó a 110 °C durante 16 horas en atmósfera de nitrógeno y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna SCX-2. El producto deseado se eluyó de la columna utilizando NH<sub>3</sub> 7 M/metanol y las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar un producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 30% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (317 mg, 41.6%) como un sólido de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 1.09 (3H, d), 1.30 (3H, d), 1.47 (3H, d), 2.48 - 2.78 (4H, m), 3.30 (1H, m), 3.79 (3H, s), 5.09 (1H, s), 6.40 (1H, d), 7.12 (1H, td), 7.17 (1H, td), 7.29 (1H, d), 7.34 (2H, d), 7.43 (2H, d), 7.54 (1H, d), 7.66 (2H, m). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 421.

**Ejemplo 3: ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico**



Se añadió hidróxido de sodio 2 M (3.0 mL, 6.00 mmol) a una solución de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (275 mg, 0.60 mmol) en THF (1.5 mL) / metanol (1.5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadieron EtOAc (15 mL) y agua (15 mL) y a continuación el pH de la fase acuosa se ajustó hasta ~7 mediante la adición de HCl 2 N. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de metanol en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar el producto del título (250 mg, 94%) como un sólido de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 0.77 (3H, d), 1.06 (3H, d), 1.93 (1H, m), 2.18 (1H, dd), 2.58 (1H, dd), 2.65 (1H, dd), 2.84 (1H, dd), 3.35 (1H, dd), 4.32 (1H, d), 4.44 (1H, d), 5.16 (1H, s), 6.67 (1H, d), 6.93 - 7.04 (2H, m), 7.21 (1H, d), 7.42 (1H, d), 7.46 (2H, m), 7.54 (1H, d), 10.57 (1H, s), 12.51 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 443.

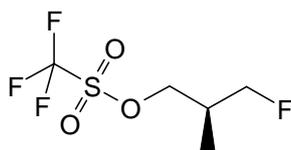
El (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

**Preparación de (*S*)-3-fluoro-2-metilpropan-1-ol**



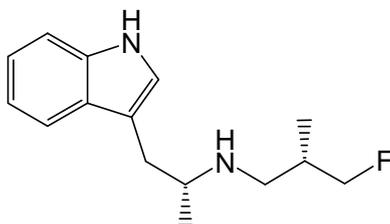
Se añadió *N,N*-dietil-1,1,2,3,3,3-hexafluoropropan-1-amina (18.25 mL, 100.57 mmol) gota a gota a una solución de (*R*)-3-hidroxi-2-metilpropanoato de metilo (9.25 mL, 83.81 mmol) en DCM (77 mL) (la reacción se calentó hasta ~40 °C). La reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se calentó a reflujo durante 4 h, antes de enfriarla hasta temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 150 mL), a continuación las fases orgánicas combinadas se secaron y se concentraron cuidadosamente. El residuo se disolvió en THF (200 mL) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió hidruro de aluminio y litio (6.45 g, 167.61 mmol) en porciones durante 15 min. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 h y se calentó hasta temperatura ambiente durante 1 h más. Después de enfriarla en un baño de hielo, la reacción se desactivó añadiendo agua (7 mL), a continuación NaOH al 15% (7 mL) y finalmente agua (21 mL). Se añadió MgSO<sub>4</sub> hasta que se formó un sólido granulado. El sólido se filtró a través de celite y se lavó con éter dietílico (50 mL). El filtrado se lavó con HCl 2 N (2 x 100 mL), a continuación la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de EtOAc en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*S*)-3-fluoro-2-metilpropan-1-ol (6.42 g, 83%) como un aceite de un color parecido al de la paja. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 0.97 (3H, dd), 1.96 - 2.14 (1H, m), 3.64 (2H, d), 4.3 - 4.42 (1H, m), 4.42 - 4.54 (1H, m), no se observó el OH.

#### 20 Preparación del trifluorometanosulfonato de (*S*)-3-fluoro-2-metilpropilo

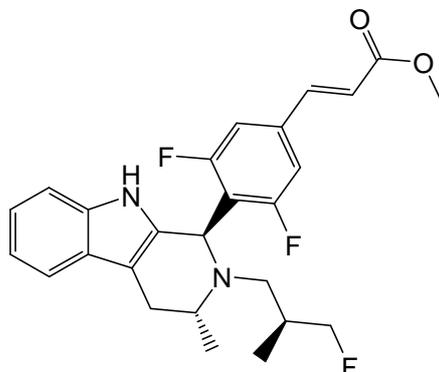


A una solución agitada de (*S*)-3-fluoro-2-metilpropan-1-ol (7.9 g, 85.77 mmol) en DCM (140 mL) a 0 °C, se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (17.31 mL, 102.92 mmol) gota a gota y a continuación se añadió 2,6-dimetilpiridina (11.95 mL, 102.92 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 45 min y a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (60 mL), se lavó secuencialmente con HCl 1 M (3 x 100 mL), una solución saturada de bicarbonato de sodio (100 mL) y salmuera saturada (50 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta casi sequedad. La solución se filtró a través de un lecho de sílice, se lavó con DCM (50 mL) y se evaporó para obtener el trifluorometanosulfonato de (*S*)-3-fluoro-2-metilpropilo (14.38 g, 74.8%) como un aceite de color marrón. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) δ 1.09 (3H, dd), 2.24 - 2.44 (1H, m), 4.30 (0.5H, dd), 4.37 - 4.46 (1H, m), 4.52 (2.5H, tt).

#### 35 Preparación de (*S*)-*N*-((*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-3-fluoro-2-metilpropan-1-amina



Se añadió trifluorometanosulfonato de (*S*)-3-fluoro-2-metilpropilo (666 mg, 2.97 mmol) a una solución de (*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina (470 mg, 2.7 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (0.700 mL, 4.05 mmol) en 1,4-dioxano (6.05 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (20 mL) y se lavó con agua (20 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL) y a continuación las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de metanol en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*S*)-*N*-((*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)-3-fluoro-2-metilpropan-1-amina (590 mg, 88%) como un aceite de color marrón. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 0.86 (3H, dd), 1.20 (3H, d), 1.94 - 2.11 (1H, m), 2.64-2.74 (2H, m), 2.85 - 2.98 (2H, m), 3.05 - 3.15 (1H, m), 4.13 - 4.39 (2H, m), 7.09 (1H, d), 7.12 (2H, ddd), 7.20 (1H, ddd), 7.33 - 7.41 (1H, m), 7.56 - 7.65 (1H, m), 8.10 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 249.

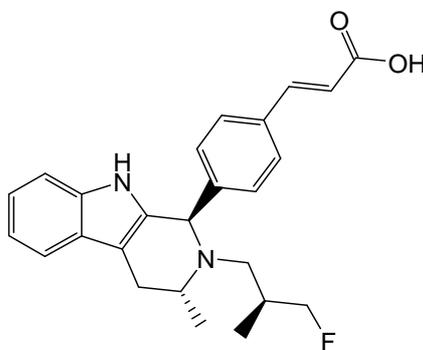
**Preparación de (E)-3-(3,5-difluoro-4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo**

5

Se añadió ácido acético (2.0 mL) a una solución de (S)-N-((R)-1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-3-fluoro-2-metilpropan-1-amina (273 mg, 1.10 mmol) y (E)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 1) (226 mg, 1 mmol) en tolueno (8.0 mL). La reacción se calentó hasta 95 °C durante 2.5 h. Los componentes volátiles se eliminaron al vacío y después se hizo pasar el residuo a través de una columna SCX-2. A continuación, la columna se eluyó con NH<sub>3</sub> 7 M/metanol para liberar el producto. Se concentró el filtrado y el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de metanol en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (E)-3-(3,5-difluoro-4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (282 mg, 61.8%) como un sólido de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 0.82 (3H, d), 1.12 (3H, d), 1.81 – 1.99 (1H, m), 2.24 (1H, ddd), 2.64 (1H, ddd), 2.71 (1H, dd), 2.93 – 3.01 (1H, ddd), 3.42 (1H, dc), 3.81 (3H, s), 4.25 – 4.39 (1H, m), 4.38 – 4.53 (1H, m), 5.20 (1H, s), 6.39 (1H, d), 6.99 (2H, m), 7.06 – 7.16 (2H, m), 7.21 – 7.25 (1H, m), 7.52 (3H, m). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 457.

**Ejemplo 4: ácido (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico**

20



25

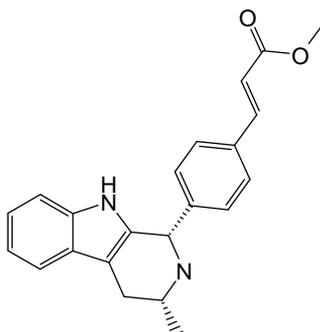
Se añadió una solución de hidróxido de sodio 7.5 M (0.904 mL, 6.78 mmol) a una solución de (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (285 mg, 0.68 mmol) en metanol (3 mL). La mezcla se agitó a 20 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna SCX-2. Las fracciones que contenían el producto deseado se eluyeron de la columna utilizando NH<sub>3</sub> 7 M/metanol y las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar un sólido de color amarillo. El producto crudo se purificó mediante LCMS preparativa (columna Phenomenex Gemini-NX axia Prep C18 OBD, sílice de 5 μ, 50 mm de diámetro, 100 mm de longitud), utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (que contenía un 1% de NH<sub>3</sub>) y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar el producto del título (80 mg, 29.0%) como un sólido de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 33 °C) δ 0.87 (3H, d), 1.04 (3H, d), 1.91 - 2.27 (2H, m), 2.50 (1H, p), 2.57 - 2.75 (2H, m), 3.13 (1H, s), 4.51 (2H, dd), 4.86 (1H, s), 6.47 (1H, d), 6.92 - 6.99 (1H, m), 7 - 7.09 (1H, m), 7.15 - 7.35 (3H, m), 7.35 - 7.5 (2H, m), 7.57 (2H, d), 10.64 (1H, d), no se observó el CO<sub>2</sub>H. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 407.

30

El (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

40

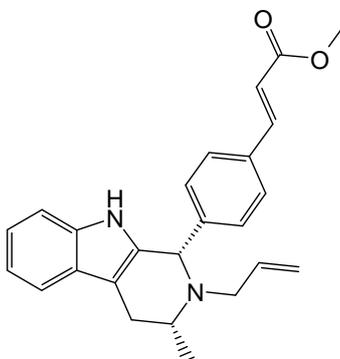
**Preparación de (E)-3-(4-((1S,3R)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo**



5 Se añadió (*E*)-3-(4-formilfenil)acrilato de metilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 2) (18.56 g, 97.57 mmol) a una solución agitada de (*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina (17 g, 97.57 mmol) en ácido acético (250 mL) a 23 °C en atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se agitó a 80 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, se volvió a disolver en DCM (500 mL) y se lavó secuencialmente con NaHCO<sub>3</sub> saturado (300 mL x 2), NaOH (ac.) 2 M (300 mL), agua (300 mL) y salmuera saturada (300 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y evaporó para obtener el producto  
10 crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 1 hasta un 7% de metanol en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (25.1 g, 74.3%) como una espuma de color beis. El producto era principalmente el isómero *cis*, que contenía aproximadamente un 12% del isómero *trans*, el cual resultó ser inseparable. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 1.25 (3H, d), 2.37 - 2.48 (1H, m), 2.74 (1H, d), 3.12 (1H, s), 3.73 (3H, s), 5.18 (1H, s), 6.64 (1H, d), 6.97 (2H, dd), 7.19 (1H, d), 7.36 - 7.46 (3H, m), 7.64 - 7.75 (3H, m), 10.19 (1H, s), no se observó el NH. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 347.

**Preparación de (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-2-alil-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo**

20

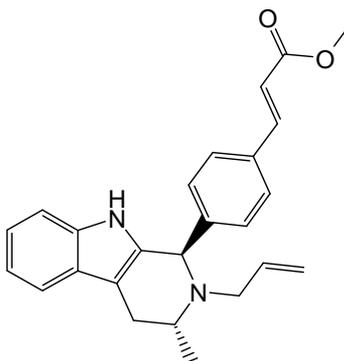


25 El (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (35 g, 101.03 mmol), 3-bromoprop-1-eno (9.62 mL, 111.14 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (19.36 mL, 111.14 mmol) se suspendieron en acetonitrilo (160 mL), se burbujeó nitrógeno a través durante 5 min y a continuación la mezcla se selló en un tubo para microondas. La reacción se calentó hasta 140 °C durante 3.5 horas en el reactor de microondas y se enfrió hasta temperatura ambiente.

30 La mezcla de reacción se evaporó a sequedad, se volvió a disolver en DCM (100 mL) y se lavó secuencialmente con ácido cítrico 1 M (100 mL), agua (100 mL) y salmuera saturada (100 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para obtener el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 20% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar una mezcla 50:50 de (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-alil-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo: (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-2-alil-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (10.00 g, 25.6%) como un sólido de color amarillo pálido. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 387.

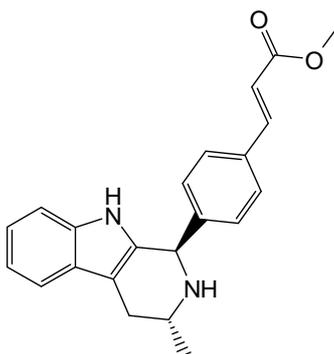
**Preparación de (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-alil-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo**

40



5 Se añadió ácido trifluoroacético (5.59 mL, 75.29 mmol) al (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-2-*alil*-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo (9.7 g, 25.10 mmol) en DCM (100 mL) a 20 °C en atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se agitó a 20 °C durante 3 días. La mezcla de reacción se diluyó cuidadosamente con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (250 mL) y la fase de DCM se lavó secuencialmente con agua (250 mL) y salmuera saturada (250 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para obtener el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 10 hasta un 20% de EtOAc en heptano. Las fracciones se evaporaron a sequedad para proporcionar una mezcla 65:35 de (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-*alil*-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo: (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-2-*alil*-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo (7.99 g, 82%) como un sólido de color amarillo pálido. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 387.

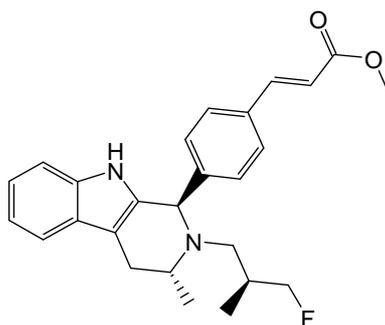
15 **Preparación de (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo**



20 Se hicieron reaccionar siete lotes por separado de (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-*alil*-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo: (*E*)-3-(4-((1*S*,3*R*)-2-*alil*-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo 65:35 (2.00 g, 5.17 mmol) como se indica a continuación.

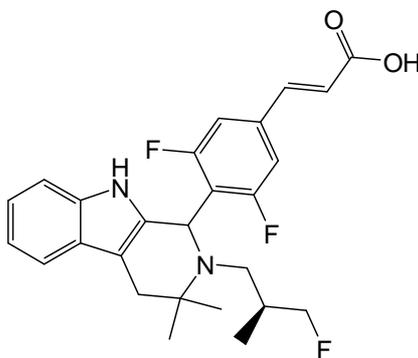
25 El (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-*alil*-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo (2.00 g, 5.17 mmol) y clorotris(trifenilfosfina)rodio (I) (catalizador de Wilkinson) (2.346 g, 2.54 mmol) se suspendieron en acetonitrilo (12 ml) y agua (2.4 mL), y se burbujeó nitrógeno a través durante 5 min antes de sellar la mezcla en un tubo para microondas. La reacción se calentó hasta 100 °C durante 60 min en el reactor de microondas y se enfrió hasta temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se combinaron, se evaporaron a sequedad, se volvieron a disolver en DCM (200 mL) y se añadió una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (200 mL). La fase orgánica se lavó secuencialmente con agua (200 mL) y salmuera saturada (200 mL) antes de secarla con MgSO<sub>4</sub>, filtrarla y evaporarla para proporcionar el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 5% de metanol en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo (7.02 g, 55.9%) como un sólido de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 1.14 (3H, d), 2.27 - 2.4 (1H, m), 2.81 (1H, dd), 2.94 - 3.05 (1H, m), 3.72 (3H, s), 5.19 (1H, s), 6.60 (1H, d), 6.94 - 7 (1H, m), 7.01 - 7.09 (1H, m), 7.26 (3H, d), 7.43 (1H, d), 7.59 - 7.68 (3H, m), 10.70 (1H, s), no se observó el NH. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 347.

35 **Preparación de (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-((*S*)-3-*fluoro*-2-*metil*propil)-3-*metil*-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-*pirido*[3,4-*b*]indol-1-*il*)fenil)acrilato de metilo**



Se añadió trifluorometanosulfonato de (S)-3-fluoro-2-metilpropilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 3) (291 mg, 1.30 mmol) a una solución de (E)-3-(4-((1R,3R)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (300 mg, 0.87 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0.226 mL, 1.30 mmol) en 1,4-dioxano (5 mL). La mezcla se agitó a 90 °C durante 1 hora, a continuación la mezcla se evaporó a sequedad y el residuo se repartió entre DCM (30 mL) y agua (30 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (30 mL) y los extractos se combinaron con la fase orgánica. Los extractos combinados se filtraron a través de un papel de separación de fases y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un disolvente de elución de un 15% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (E)-3-(4-((1R,3R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (314 mg, 86%) como un sólido de color blanquecino. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 0.87 (3H, d), 1.06 (3H, d), 1.9 - 2.28 (2H, m), 2.55 - 2.8 (3H, m), 2.97 - 3.21 (1H, m), 3.72 (3H, s), 4.31 - 4.69 (2H, m), 4.88 (1H, s), 6.60 (1H, dd), 6.98 (1H, t), 7.04 (1H, t), 7.17 - 7.35 (3H, m), 7.44 (1H, d), 7.55 - 7.76 (3H, m), 10.65 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 421.

**Ejemplo 5: ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico (isómero 1)\***

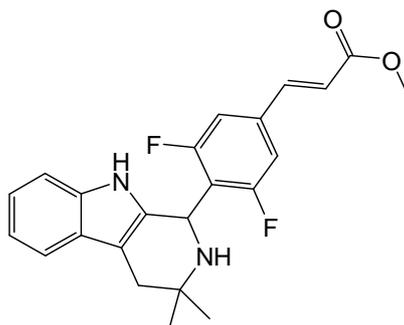


Se añadió hidróxido de sodio (184 mg, 4.61 mmol) al (E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) (217 mg, 0.46 mmol) en THF (1 mL)/metanol (1 mL). La solución resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas. La reacción se diluyó con agua (10 mL) y el pH se ajustó hasta 7 mediante la adición de HCl 2 N. La solución se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 50% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron para obtener un material crudo. El producto crudo se lavó disgregándolo con una mezcla de éter dietílico/isohehexano para obtener el producto del título (53.0 mg, 25.2%) como un sólido de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) δ 0.54 (3H, d), 1.06 (3H, s), 1.34 (3H, s), 2.14 (1H, dd), 2.66 (1H, d), 2.83 (1H, d), 3.03 (1H, dd), 4.21 (1H, t), 4.33 (1H, t), 5.12 (1H, s), 6.73 (1H, d), 7.01 (2H, dtd), 7.14 - 7.28 (1H, m), 7.43 (1H, d), 7.54 (2H, s), 7.59 (1H, d), 10.50 (1H, s), 12.61 (1H, s), no se observó el CO<sub>2</sub>H. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 457.

\*Se infiere que la estereoquímica es (R) en el centro indefinido mediante la analogía con otros ejemplos, es decir compuestos de los que se ha inferido que son: ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(1R)-2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-il)fenil)acrílico.

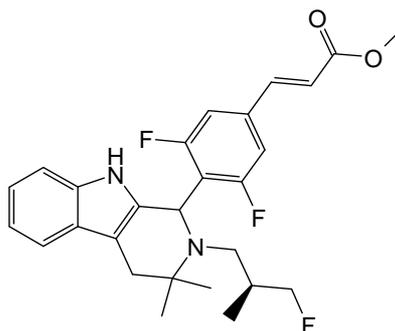
El 3-(3,5-difluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato (isómero 1) utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

**Preparación de (E)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)-3,5-difluorofenil)acrilato de metilo**



5 La 1-(1*H*-indol-3-il)-2-metilpropan-2-amina (807 mg, 4.29 mmol) y el (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 1) (970 mg, 4.29 mmol) se combinaron en ácido acético (15 mL) y la mezcla se calentó hasta 80 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna SCX-2. El producto deseado se eluyó de la columna utilizando NH<sub>3</sub> 2 M en metanol y las fracciones que contenían el producto se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)-3,5-difluorofenil)acrilato de metilo (1610 mg, 95%) como una espuma de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 20 °C) δ 1.15 (3H, s), 1.27 (3H, s), 2.23 (1H, s), 2.61 (2H, s), 3.75 (3H, s), 5.46 (1H, s), 6.84 (1H, d), 6.97 (2H, dtd), 7.18 (1H, d), 7.39 (1H, d), 7.58 (2H, s), 7.67 (1H, d), 10.60 (1H, s). m/z: ES- [M-H]- 395.

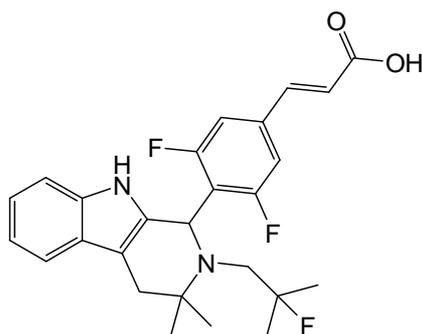
15 **Preparación de (E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1)**



20 Se añadió trifluorometanosulfonato de (*S*)-3-fluoro-2-metilpropilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 3) (0.339 g, 1.51 mmol) a una solución de (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)-3,5-difluorofenil)acrilato de metilo (0.3 g, 0.76 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (0.458 mL, 2.65 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL). Se continuó agitando durante 24 horas, a continuación los componentes volátiles se eliminaron al vacío y el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 25% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (0.202 g, 36%) como un sólido blanco. El material se combinó con otro lote (0.36 g) y se purificó mediante HPLC preparativa (columna Chiralpak IA, sílice de 20 µm, 20 mm de diámetro, 250 mm de longitud), heptano:IPA 70:30 a 80 mL/min (4 inyecciones). Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1, primero eluido, 217 mg) y (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 2, segundo eluido, 165 mg). El análisis se llevó a cabo en una columna Chiralpak IA, sílice de 5µm, 4.6 mm de diámetro, 50 mm de longitud, heptano:IPA 70:30 a 2 mL/min.

35 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C) δ 0.50 (3H, d), 1.02 (3H, s), 1.30 (3H, s), 2.11 (1H, dd), 2.62 (2H, d), 2.80 (1H, d), 2.99 (1H, dd), 3.74 (3H, s), 4.09 - 4.23 (1H, m), 4.29 (1H, d), 5.09 (1H, s), 6.81 (1H, d), 6.97 (2H, dt), 7.16 (1H, d), 7.39 (1H, d), 7.53 (2H, d), 7.64 (1H, d), 10.44 (1H, s). m/z: ES+ [M+H]+ 471.

40 **Ejemplo 6: ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilico (isómero 1)\***

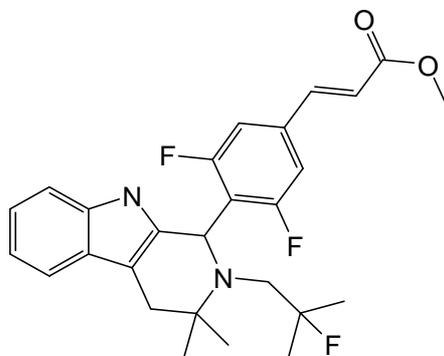


Se añadió hidróxido de sodio 2 M (1.6 mL, 3.20 mmol) a una solución de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) (148 mg, 0.31 mmol) en THF (0.8 mL)/metanol (0.8 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadieron EtOAc (15 mL) y agua (15 mL), y el pH de la fase acuosa se ajustó hasta ~7 mediante la adición de HCl 2 N. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 25 hasta un 100% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar el producto del título (isómero 1) (124 mg, 86%) como un sólido de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 1.03 (3H, d), 1.08 (3H, s), 1.16 (3H, d), 1.35 (3H, s), 2.56 (1H, dd), 2.66 (1H, d), 3.02 (1H, d), 3.17 (1H, dd), 5.24 (1H, s), 6.39 (1H, d), 7.00 (2H, d), 7.05 - 7.16 (2H, m), 7.20 (1H, dd), 7.28 (1H, s), 7.49 (1H, dd), 7.61 (1H, d), no se observó el CO<sub>2</sub>H. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 457.

\*Se infiere que la estereoquímica es (*R*) en el centro indefinido mediante la analogía con otros ejemplos.

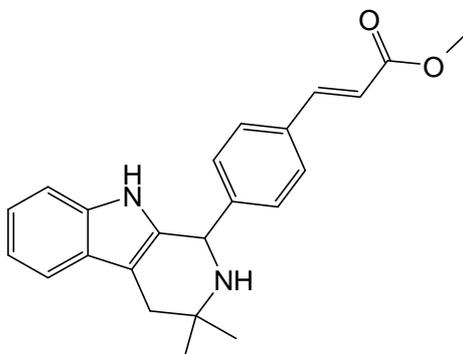
El (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

**Preparación de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1)**



Se añadió trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 1) (679 mg, 3.03 mmol) a una solución de (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)-3,5-difluorofenil)acrilato de metilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 5) (600 mg, 1.51 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (0.915 mL, 5.30 mmol) en 1,4-dioxano (2.5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, la reacción se calentó hasta 105 °C durante 88 horas. Los componentes volátiles se eliminaron al vacío y el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 50% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (430 mg, 60.4%) como un sólido blanco. El producto racémico se purificó mediante HPLC preparativa (columna Chiralpak AD, sílice de 20 μm, 50 mm de diámetro, 250 mm de longitud), heptano:etanol 90:10 a 90 mL/min. Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1, primero eluido, 149 mg, 34.6%) y (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 2, segundo eluido, 143 mg, 33.3%) como sólidos de color crema. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 1.01 (3H, d), 1.08 (3H, s), 1.15 (3H, d), 1.34 (3H, s), 2.55 (1H, dd), 2.66 (1H, d), 2.98 - 3.06 (1H, m), 3.17 (1H, dd), 3.80 (3H, s), 5.23 (1H, s), 6.38 (1H, d),



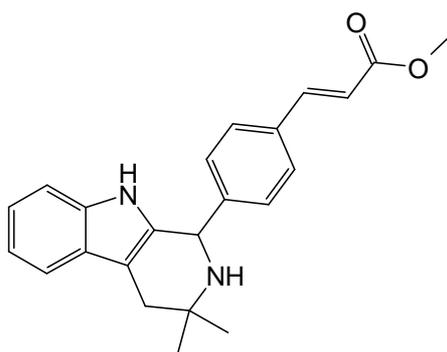
**Preparación de (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (racemato)**

5

Se añadió (*E*)-3-(4-formilfenil)acrilato de metilo (41.8 g, 219.62 mmol) (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 2) en una porción a 1-(1*H*-indol-3-il)-2-metilpropan-2-amina (43.8 g, 219.62 mmol) en ácido acético (314 mL) en atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se agitó a 80 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Se añadió tolueno (200 mL) y el residuo se evaporó a sequedad.

El tratamiento azeotrópico se repitió dos veces más para obtener un sólido de color marrón. Este se agitó en EtOAc/heptano 1:1 (500 mL) durante 30 min antes de filtrarlo y lavarlo con EtOAc/heptano 1:1. El compuesto se secó al aire para obtener un sólido blanco. El material crudo se suspendió en 2-metiltetrahydrofurano (750 mL) y se añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio durante 10 min a la mezcla agitada (efervescencia), la mezcla se agitó hasta que se disolvió el material y la fase acuosa permaneció básica. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío para obtener una espuma de color amarillo pálido (~78 g). El material se disolvió en éter dietílico (200 mL) y se concentró a sequedad (se repitió dos veces). En la segunda adición, se obtuvo un sólido propiamente dicho. Este se agitó en éter dietílico y se evaporó a sequedad para obtener (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (racemato) (73.6 g, 89%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 1.26 (3H, s), 1.35 (3H, s), 1.42 (1H, s a), 2.69 - 2.82 (2H, m), 3.80 (3H, s), 5.12 (1H, s), 6.41 (1H, d), 7.06 - 7.16 (2H, m), 7.21 (1H, dd), 7.37 (2H, d), 7.46 - 7.54 (4H, m), 7.67 (1H, d). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 361.

25

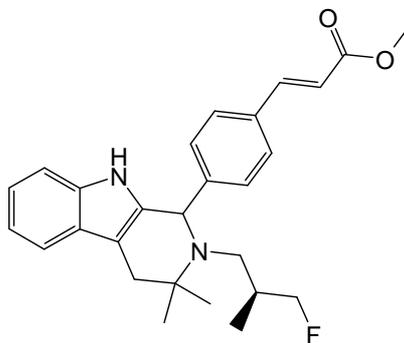
**Preparación de (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1)**

30

El (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (racemato) (65 g) se purificó en siete inyecciones como se indica a continuación.

El material racémico se purificó mediante HPLC preparativa (columna Chiralpak OD, sílice de 20 μm, 100 mm de diámetro, 250 mm de longitud), heptano:IPA 50:50. Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1, primero eluido, 30.3 g, 93%) y (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 2, segundo eluido, 28.2 g, 86%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 1.27 (3H, s), 1.36 (3H, s), 2.69 - 2.82 (2H, m), 3.80 (3H, s), 5.14 (1H, s), 6.43 (1H, d), 7.12 (2H, pd), 7.2 - 7.24 (1H, m), 7.39 (3H, d), 7.51 (3H, d), 7.68 (1H, d), no se observó el NH. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 361.

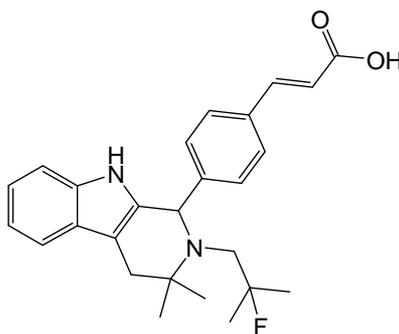
40

**Preparación de (E)-3-(4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1)**

5

Se añadió trifluorometanosulfonato de (S)-3-fluoro-2-metilpropilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 3) (5.32 g, 21.36 mmol) a una solución de (E)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) (3.5 g, 9.71 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (6.34 mL, 36.41 mmol) en 1,4-dioxano (17.5 mL). La mezcla se agitó a 22 °C durante 3 días. La mezcla se evaporó y el residuo se repartió entre DCM (150 mL) y agua (150 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (50 mL) y los extractos se combinaron con la fase orgánica. Los extractos combinados se filtraron a través de un papel de separación de fases y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un disolvente de elución de un 15% de EtOAc en heptano. Las fracciones que contenían cantidades significativas de producto empezaron a formar cristales; los tubos se agitaron para propiciar una cristalización adicional. Los cristales se recolectaron por filtración y se lavaron con una pequeña cantidad de EtOAc al 15% en heptano para proporcionar (E)-3-(4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) (2.91 g, 69.0%) como un sólido cristalino blanco. Las aguas madre de la cristalización y otras fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporaron. El residuo se recrystalizó en EtOAc/heptano para proporcionar más 3-(4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato (isómero 1) como un sólido cristalino blanco (635 mg, 15.1%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 0.53 (3H, d), 0.95 - 1.07 (1H, m), 1.09 (3H, s), 1.32 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.66 (1H, d), 2.94 (1H, d), 2.97 (1H, d), 3.80 (3H, s), 4.14 (1H, ddd), 4.31 (1H, ddd), 4.59 (1H, s), 6.42 (1H, d), 7.05 - 7.11 (2H, m), 7.13 (1H, s), 7.17 (1H, dd), 7.35 (2H, d), 7.45 (2H, d), 7.50 (1H, dd), 7.67 (1H, d). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 435.

25

**Ejemplo 8: ácido (E)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilico (isómero 1)**

30

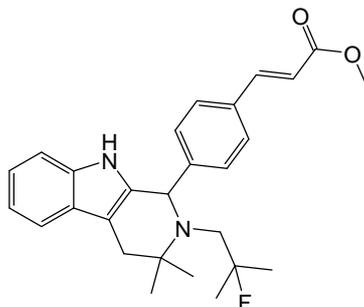
Se añadió una solución de hidróxido de sodio 2 M (0.782 mL, 1.56 mmol) a una solución de (E)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) (68 mg, 0.16 mmol) en metanol (5 mL), THF (5.00 mL) y agua (5.00 mL) y la mezcla se agitó durante 40 horas a 22 °C. La mezcla se concentró hasta un volumen tal que se hubiera eliminado todo el disolvente orgánico y se acidificó hasta un pH de 6 con HCl 2 M. Se añadió amoníaco acuoso concentrado (2 gotas) seguido de metanol (~2 mL), para obtener una solución de color amarillo pálido. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, sílice de 5 μ, 50 mm de diámetro, 100 mm de longitud), utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (que contenía un 1% de NH<sub>3</sub>) y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar el producto del título (isómero 1) (50.0 mg, 76%) como un sólido de color amarillo. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 30 °C) δ 0.93 (3H, s), 1.19 (3H, d), 1.23 (3H, s), 1.51 (3H, d), 2.56 - 2.64 (2H, m), 2.75 (1H, d), 3.04 (1H, dd), 5.06 (1H, s), 6.40 (1H, d), 7.03 (1H, ddd), 7.09 - 7.15 (2H, m), 7.35 (1H, dd), 7.44 - 7.51 (5H, m), 10.87 (1H, s), no se observó el CO<sub>2</sub>H. m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 421.

40

\*Se infiere que la estereoquímica es (*R*) en el centro indefinido mediante la analogía con otros ejemplos.

5 El (*E*)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1) utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

**Preparación de (*E*)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1)**



10

Se añadió trifluorometanosulfonato de 2-fluoro-2-metilpropilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 1) (389 mg, 1.73 mmol) a una solución de (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (racemato) (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 7) (250 mg, 0.69 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (0.453 mL, 2.60 mmol) en 1,4-dioxano (1.25 mL). La mezcla se agitó a 95 °C durante 64 horas y a continuación se repartió entre DCM (30 mL) y agua (30 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (20 mL) y los extractos se combinaron con la fase orgánica. Los extractos combinados se filtraron a través de un papel de separación de fases y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un disolvente de elución de un 15% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (racemato) (178 mg, 59.1%) como un sólido de color beis. El producto racémico se purificó mediante HPLC preparativa (columna Chiralpak AD, sílice de 20 µm, 50 mm de diámetro, 250 mm de longitud), heptano:etanol 80:20. Las fracciones que contenían los compuestos deseados se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 1, primero eluido, 70 mg) y

15

20

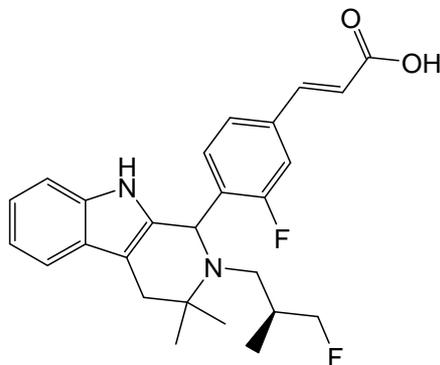
25

30

(*E*)-3-(4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (isómero 2, segundo eluido, 66 mg). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) δ 1.00 (3H, s), 1.13 (3H, d), 1.20 (3H, s), 1.44 (3H, d), 2.57 - 2.78 (3H, m), 2.93 (1H, dd), 3.80 (3H, s), 5.05 (1H, s), 6.41 (1H, d), 7.13 (1H, ddd), 7.18 (1H, ddd), 7.32 (1H, d), 7.43 (2H, d), 7.51 (2H, d), 7.54 (1H, d), 7.64 (1H, s), 7.67 (1H, d). m/z: ES+ [M+H]<sup>+</sup> 435.

**Ejemplo 9: ácido (*E*)-3-(3-fluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico (isómero 1)**

35



40

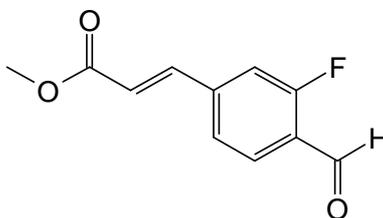
Se añadió hidróxido de sodio 2 M (3.31 mL, 6.63 mmol) a una solución de (*E*)-3-(3-fluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (600 mg, 1.33 mmol) (mezcla de diastereoisómeros) en metanol (5 mL) y THF (20 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se concentró hasta un volumen tal que se hubiera eliminado todo el disolvente orgánico, se diluyó con agua (50 mL), se acidificó con HCl diluido hasta un pH de 6 y se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 mL). Los extractos se combinaron y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó

mediante HPLC preparativa (columna Chiralpak IA, sílice de 20  $\mu\text{m}$ , 20 mm de diámetro, 250 mm de longitud), heptano:IPA 90:10 con un 0.2% de ácido acético a 80 mL/min. Las fracciones que contenían los compuestos deseados se combinaron y se analizaron para proporcionar el ácido (*E*)-3-(3-fluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico (isómero 1, primero eluido, 130 mg, 22.36%) y el ácido (*E*)-3-(3-fluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico (isómero 2, segundo eluido, 30.0 mg, 5.16%).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO, 30 °C)  $\delta$  0.49 (3H, d), 1.03 (3H, s), 1.14 - 1.21 (1H, m), 1.28 (3H, s), 2.17 (1H, dd), 2.59 - 2.71 (1H, m), 2.8 - 2.99 (2H, m), 4.09 - 4.34 (2H, m), 4.99 (1H, s), 6.59 (1H, d), 6.86 - 7.07 (2H, m), 7.1 - 7.19 (1H, m), 7.18 - 7.29 (1H, m), 7.36 - 7.49 (2H, m), 7.49 - 7.66 (2H, m), 10.31 (1H, s), no se observó el  $\text{CO}_2\text{H}$ . m/z:  $\text{ES}^+$  [M+H] $^+$  439.

\*Se infiere que la estereoquímica es (*R*) en el centro indefinido mediante la analogía con otros ejemplos.

El (*E*)-3-(3-fluoro-4-(2-((*S*)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (mezcla de diastereómeros) utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

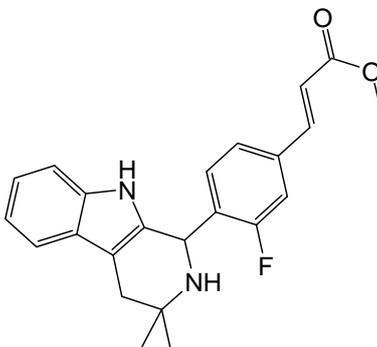
#### Preparación de (*E*)-3-(3-fluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo



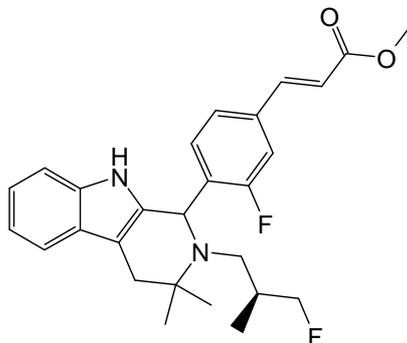
Se añadió DMA completamente desgasificada (150 mL) a 4-bromo-2-fluorobenzaldehído (20.88 g, 102.87 mmol) y acrilato de metilo (13.98 mL, 154.30 mmol), y después se añadieron tri-*o*-tolilfosfina (3.13 g, 10.29 mmol), acetato de paladio (II) (1.155 g, 5.14 mmol) y trietilamina (28.7 mL, 205.74 mmol). La reacción se agitó y se calentó hasta 100 °C durante 16 horas. Se añadió más tri-*o*-tolilfosfina (3.13 g, 10.29 mmol) y acetato de paladio (II) (1.155 g, 5.14 mmol) y la mezcla de reacción se calentó hasta 110 °C durante 2 horas más. Se añadió agua (1 L) y la mezcla de reacción se extrajo con DCM (2 x 500 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se evaporaron para obtener un sólido de color marrón. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 25% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para obtener (*E*)-3-(3-fluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (15.20 g, 71.0%) como un sólido de color amarillo.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 30 °C)  $\delta$  3.83 (3H, s), 6.53 (1H, d), 7.31 (1H, dd), 7.41 (1H, d), 7.65 (1H, d), 7.79 - 8 (1H, m), 10.25 - 10.41 (1H, m). No se observó el ión de la masa en LCMS.

#### Preparación de (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)-3-fluorofenil)acrilato de metilo (racemato)



Se agitaron 1-(1*H*-indol-3-il)-2-metilpropan-2-amina (1 g, 5.31 mmol) y (*E*)-3-(3-fluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (1.106 g, 5.31 mmol) en ácido acético (15 mL) a 80 °C durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno. El producto crudo se purificó por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna SCX-2. El producto deseado se eluyó de la columna utilizando  $\text{NH}_3$  7 M/metanol y las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)-3-fluorofenil)acrilato de metilo (racemato) (2.000 g, 99%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO, 30 °C)  $\delta$  1.14 (3H, s), 1.27 (3H, s), 2.52 - 2.74 (2H, m), 3.74 (3H, s), 5.12 (1H, s), 6.69 (1H, d), 6.86 - 7.05 (2H, m), 7.20 (1H, d), 7.25 - 7.33 (2H, m), 7.39 (1H, d), 7.73 (1H, d), 7.85 (1H, t), 10.29 (1H, s), no se observó el NH. m/z:  $\text{ES}^+$  [M+H] $^+$  379.

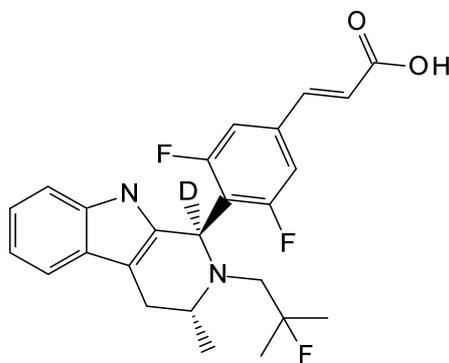
**Preparación de (E)-3-(3-fluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (mezcla de diastereómeros)**

5

Se añadió trifluorometanosulfonato de (S)-3-fluoro-2-metilpropilo (obtenido como se ha descrito en la preparación de los materiales de partida del Ejemplo 3) (1.259 g, 5.62 mmol) a una solución de (E)-3-(4-(3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)-3-fluorofenil)acrilato de metilo (racemato) (850 mg, 2.25 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (1.467 mL, 8.42 mmol) en 1,4-dioxano (5 mL). La mezcla se calentó a 60 °C durante 4 horas y a continuación se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla se repartió entre acetato de etilo (25 mL) y agua (25 mL). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 mL) y los extractos se combinaron con la fase orgánica. Los extractos combinados se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un disolvente de elución de un 10% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (E)-3-(3-fluoro-4-(2-((S)-3-fluoro-2-metilpropil)-3,3-dimetil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (mezcla de diastereoisómeros) (600 mg, 59.0%). m/z: ES+ [M+H]+ 453.

**Ejemplo 10: ácido (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-1-il]-3,5-difluorofenil]prop-2-enoico**

20



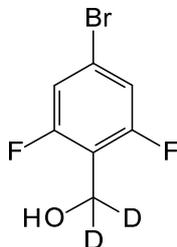
Se disolvió (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-1-il]-3,5-difluorofenil]prop-2-enoato de metilo (4.70 g, 10.27 mmol) en iPrOH (42.8 mL) y se añadió una solución de hidróxido de sodio 5 M (6.16 mL, 30.82 mmol) en una porción, a continuación la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió agua (100 mL) y el pH se ajustó hasta ~5 mediante la adición de HCl 2 N. La solución se extrajo con EtOAc (x2) y las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron al vacío. Se hizo pasar el residuo a través de un lecho de sílice, eluyendo en primer lugar con DCM y a continuación con hasta un 5% de MeOH en DCM. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron para obtener un sólido de color amarillo (~4.2 g). El residuo (4.2 g) se disolvió en EtOH (20 mL) y se calentó hasta 35 °C. Se añadió agua (30 mL) lentamente durante ~40 min. A continuación, la mezcla se agitó durante 30 minutos más y después se enfrió lentamente hasta temperatura ambiente. Se añadió más agua (30 mL) y a continuación se enfrió la reacción hasta 0 °C. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con agua antes de secarlo al vacío a 35 °C durante toda la noche para proporcionar el ácido (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-1-il]-3,5-difluorofenil]prop-2-enoico (3.34 g, 73.3%) como un sólido de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) 1.12 (3H, d), 1.19 (3H, d), 1.26 (3H, d), 2.43 (1H, dd), 2.63 (1H, dd), 2.87 (1H, dd), 3.07 (1H, dd), 3.65 (1H, c), 6.41 (1H, d), 7.02 (2H, d), 7.06 - 7.16 (2H, m), 7.19 - 7.25 (1H, m), 7.41 (1H, s), 7.48 - 7.57 (1H, m), 7.63 (1H, d), no se observó el CO<sub>2</sub>H. m/z: ES+ [M+H]+ 444.

40

Este compuesto se puede nombrar de manera alternativa ácido (*E*)-3-[4-[(1*R*,3*R*)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-*il*]-3,5-difluorofenil]acrílico.

**Preparación de (4-bromo-2,6-difluorofenil)dideuteriometanol**

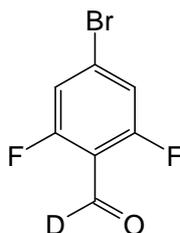
5



Se añadió borohidruro de litio deuterado (0.497 g, 17.25 mmol) en porciones a una solución de 4-bromo-2,6-difluorobenzoato de metilo (2.89 g, 11.5 mmol) en THF (46.0 mL). La reacción se calentó hasta 50 °C durante 2 horas. Después de enfriar, se añadió HCl 2 N (30 mL) cuidadosamente. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2x50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron para proporcionar (4-bromo-2,6-difluorofenil)dideuteriometanol (2.250 g, 87%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) 1.96 (1H, s), 7.07 – 7.13 (2H, m).

**Preparación de 4-bromo-2,6-difluoro-1-deuterobenzaldehído**

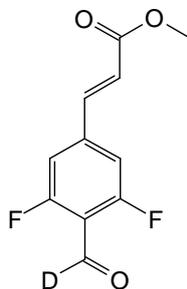
15



Se añadió el reactivo de Dess-Martin (4.98 g, 11.73 mmol) a (4-bromo-2,6-difluorofenil)dideuteriometanol (2.20 g, 9.78 mmol) en DCM (39.1 mL) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 1 hora y a continuación se desactivó añadiendo NaHCO<sub>3</sub> sat. (50 mL) que contenía un 10% de tiosulfato de sodio. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con DCM (2x50 mL). Las fases orgánicas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron, a continuación el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 25% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar 4-bromo-2,6-difluoro-1-deuterobenzaldehído (2.040 g, 94%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 30 °C) 7.18 – 7.25 (2H, m). No se observó el ión de la masa.

**Preparación de (*E*)-3-(4-deuteriocarbonil-3,5-difluorofenil)prop-2-enoato de metilo**

20



30

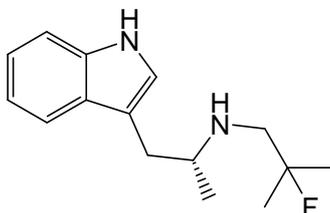
Se disolvieron 4-bromo-2,6-difluoro-1-deuterobenzaldehído (3.33 g, 15.0 mmol), trietilamina (4.18 mL, 30.00 mmol), acetato de paladio (II) (0.168 g, 0.75 mmol) y tritolilfosfina (0.457 g, 1.50 mmol) en DMF (36.6 mL), la cual se había desgasificado. A continuación, se añadió acrilato de metilo (2.026 mL, 22.50 mmol) y la reacción se calentó hasta 80 °C durante 4 horas. Después de enfriar, la mezcla se añadió a agua (150 mL) y se extrajo con EtOAc (2 x 150 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl 2 N (100 mL) y después con salmuera (100 mL), a continuación se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 40% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(4-deuteriocarbonil-3,5-difluorofenil)prop-2-

35

enoato de metilo (2.93 g, 86%) como un sólido amarillo.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 30 °C) 3.83 (3H, d), 6.51 (1H, d), 7.12 (2H, m), 7.57 (1H, d).  $m/z$  (ES+),  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 228$ .

**(R)-N-(1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina**

5



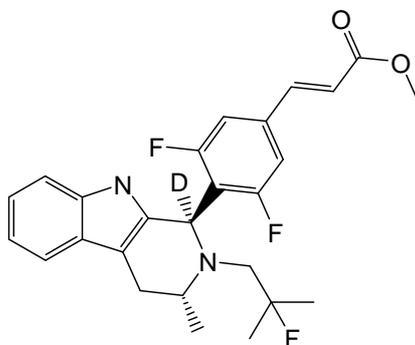
Se añadió (2R)-1-(1H-indol-3-il)propan-2-amina (3.81 kg, 21.21 mol) a un recipiente de 100 L con camisa y revestido con vidrio en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió 1,4-dioxano (23 L) y se encendió el agitador. Se añadió diisopropiltilamina (5.55 L, 31.82 mol) a la suspensión agitada y a continuación se añadió trifluorometanosulfonato de (2-fluoro-2-metilpropilo) (5.55 kg, 23.77 mol). Se añadió 1,4-dioxano (4 L) al recipiente y la mezcla se calentó hasta 75 °C. Se continuó calentando durante 24 horas antes de enfriar la mezcla hasta 25 °C. Se añadió agua (30.5 L) al recipiente y a continuación tolueno (30.5 L). Después de 40 minutos, se detuvo el agitador y se permitió que se separaran las fases. Se retiró la fase acuosa y se añadió agua (30.5 L) a la solución orgánica. La mezcla se agitó durante 15 minutos antes de permitir que se separaran las fases. La fase acuosa se retiró del recipiente. La solución orgánica se concentró mediante destilación al vacío (temperatura de la camisa: 65 °C, 110 mbar de presión) hasta que se eliminaron aproximadamente 27 L de destilado. La solución remanente en el recipiente se enfrió para proporcionar (R)-N-(1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina como una solución en tolueno (al 33% p/p) (15.4 kg, 97%).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) 0.98 (3H, d), 1.26 (3H, d), 1.30 (3H, d), 2.57 – 2.75 (3H, m), 2.81 (1H, dd), 2.84 – 2.92 (1H, m), 6.97 (1H, t), 7.06 (1H, t), 7.11 – 7.22 (1H, multiplete que se solapa con las señales del tolueno), 7.34 (1H, d), 7.52 (1H, d), 10.80 (1H, s).

15

20

**Preparación de (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-1-il]-3,5-difluorofenil]prop-2-enoato de metilo**

25



La (R)-N-(1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-2-fluoro-2-metilpropan-1-amina [al 33% p/p en tolueno] (11.26 g, 14.97 mmol) y el (E)-3-(4-deuteriocarbonil-3,5-difluorofenil)prop-2-enoato (3.40 g, 14.97 mmol) se calentaron en tolueno (55.6 mL)/ácido acético (4.28 mL, 74.83 mmol) a 80 °C durante 5 h. Después de enfriar, los componentes volátiles se eliminaron al vacío. Se añadió DCM (200 mL) al residuo y se lavó con una solución sat. de  $\text{NaHCO}_3$  (200 mL). La fase acuosa se extrajo con DCM (100 mL), a continuación las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron al vacío. El material crudo se introdujo en una columna SCX-2 y se eluyó con metanol para eliminar el aldehído que no había reaccionado. A continuación, la columna se eluyó con  $\text{NH}_3$  7 M/MeOH para liberar el producto. El filtrado básico se evaporó y el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 40% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (E)-3-[4-[(1R,3R)-1-deuterio-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-1-il]-3,5-difluorofenil]prop-2-enoato de metilo (4.70 g, 68.6%) como un sólido de color amarillo pálido.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 30 °C) 1.11 (3H, d), 1.19 (3H, d), 1.25 (3H, d), 2.42 (1H, dd), 2.62 (1H, dd), 2.87 (1H, dd), 3.07 (1H, dd), 3.65 (1H, c), 3.81 (3H, s), 6.39 (1H, d), 6.99 (2H, d), 7.06 - 7.17 (2H, m), 7.23 (1H, dd), 7.45 (1H, s), 7.49 - 7.6 (2H, m).  $m/z$ : ES+  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 458$ .

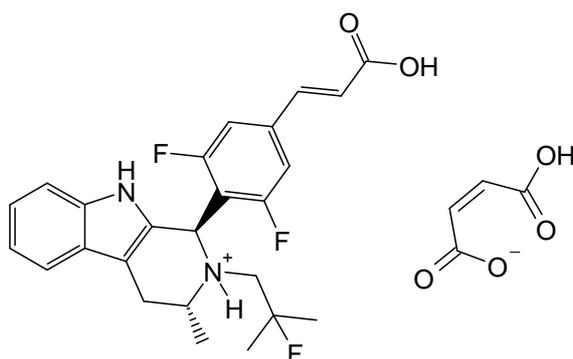
30

35

40

**Ejemplo 11: Preparación del maleato de (1R,3R)-1-[4-[(E)-2-carboxietenil]-2,6-difluorofenil]-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolin-2-ilo**

45



Una solución de ácido maleico (1.31 g, 11.29 mmol) en acetona (15 mL) se agitó en atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución del ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilico (**Ejemplo 1**) (5.00 g, 11.3 mmol) en acetona (25 mL) a la solución del ácido maleico para obtener una solución de color amarillo. El recipiente de reacción se cubrió con papel de aluminio para protegerlo de la luz y se purgó con una corriente de nitrógeno gaseoso durante toda la noche hasta que se evaporó el disolvente. Se obtuvo un sólido, el cual se secó al vacío durante 2 horas para obtener el compuesto del título como un sólido de color crema (6.23 g, 98%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 27 °C) 0.95 – 1.34 (9H, m), 2.24 – 2.45 (1H, m), 2.54 – 2.66 (1H, m), 2.8 – 2.99 (2H, m), 3.52 (1H, s), 5.22 (1H, s), 6.26 (2H, s), 6.67 (1H, d), 6.89 – 7.07 (2H, m), 7.19 (1H, d), 7.39 – 7.51 (3H, m), 7.55 (1H, d), 10.59 (1H, s).

En la Figura 8 se muestra una curva de DRXP de esta sal de tipo maleato y en la Figura 9 se muestra una curva de CDB.

### Ejemplo 12

Se fabricaron composiciones ilustrativas del Ejemplo 1 en una escala de 75 g utilizando un proceso de granulación por vía húmeda. Se pesaron el principio activo, manitol, celulosa microcristalina y glicolato de almidón sódico en las cantidades que se indican en la tabla a continuación, se transfirieron a una mezcladora-granuladora Diosna P1-6 y se mezclaron (con trituración) a 600 rpm durante 6 minutos. Para la Composición A, se continuó mezclando a la vez que se añadieron 30 mL de agua en dos alícuotas con una tasa de aproximadamente 1 mL por segundo, deteniendo la mezcla entre las alícuotas, mientras que para la Composición B una solución preparada agitando las cantidades necesarias de EDTA y ácido ascórbico con 20 mL de agua a 50 °C durante 20 minutos (protegida de la luz) se añadió utilizando un proceso análogo, comprendiendo en este caso la segunda alícuota aproximadamente 10 mL de líquido de lavado. La mezcla por vía húmeda se continuó durante un total de 1.5 minutos. Se hicieron pasar los gránulos húmedos a través de un tamiz de 1.5 mm y a continuación se secaron al vacío a 50 - 60 °C hasta obtener un contenido de humedad < 2% p/p. Los gránulos resultantes se molieron utilizando un tamiz de 1 mm y a continuación se mezclaron con el lubricante durante 5 minutos a 32 rpm utilizando una mezcladora Turbula. Se formaron comprimidos que contenían 10 mg de principio activo comprimiendo los gránulos hasta obtener un peso de compresión nominal de 100 mg utilizando una miniprensa Riva dotada de una herramienta cóncava normal de 6 mm.

Componente	Función	Composición A		Composición B	
		% p/p	Cantidad (g)	% p/p	Cantidad (g)
Forma B del Ejemplo 1	Principio activo	10.0	7.50	10.0	7.50
EDTA	Agente quelante	No está presente		0.1	0.075
Ácido ascórbico	Antioxidante	No está presente		0.5	0.375
Manitol	Diluyente	68.0	51.00	67.4	50.55
Celulosa microcristalina	Diluyente	15.0	11.25	15.0	11.25
Glicolato de almidón sódico	Desintegrante	5.0	3.75	5.0	3.75
Ácido esteárico	Lubricante	2.0	1.50	2.0	1.50
Total		100	75.00	100	75.00

Se evaluó la estabilidad de las Composiciones A y B respecto a la formación de productos de degradación (donde "productos de degradación" se refiere a (*R,E*)- 3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-*io*-1-il)fenil)acrilato) para los comprimidos envasados en botellas de HDPE de 75 cc selladas por inducción o expuestos a la atmósfera en cápsulas de Petri, almacenados en la oscuridad, con la temperatura y humedad controladas, según se indica en la tabla a continuación. Resulta evidente que la

Composición B, la cual contiene un agente quelante y un antioxidante, es más estable frente a la degradación química que la Composición A, la cual es una formulación de comprimidos estándar.

#### Estabilidad de composiciones ilustrativas respecto a la formación de productos de degradación (%)

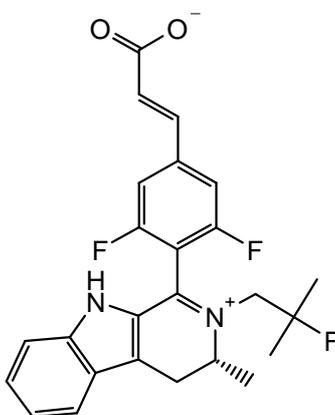
5

Formulación	Punto de evaluación inicial	Punto de evaluación a las 4 semanas (condiciones de almacenamiento)			
		(5 °C, envasado)	(25 °C/60% de HR, envasado)	(25 °C/60% de HR, expuesto)	(40 °C/60% de HR, expuesto)
Composición A	0.05	0.06	0.08	0.27	0.28
Composición B	ND	< 0.05	< 0.05	0.05	0.11

ND: No detectado (< 0.02% p/p)

10

#### Ejemplo 13: (E)-3-[3,5-difluoro-4-[(3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-2-io-1-il]fenil]prop-2-enoato



15

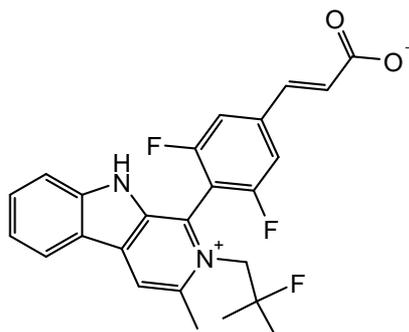
Se añadió el ácido (E)-3-(3,5-difluoro-4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenil)acrílico (200 mg, 0.45 mmol) a una solución de nitrato de amonio y cerio (248 mg, 0.45 mmol) en acetonitrilo (6 mL)/agua (1.500 mL) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 2 h y se añadió más nitrato de amonio y cerio (248 mg, 0.45 mmol). La solución se agitó a 25 °C durante 15 minutos más. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 2 M (3 mL) y se extrajo con DCM (2x10 mL). A continuación, las fases orgánicas se concentraron al vacío y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters SunFire, sílice de 5 µ, 50 mm de diámetro, 100 mm de longitud), utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (que contenía un 0.1% de ácido fórmico) y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar (R,E)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3H-pirido[3,4-b]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato) (35.0 mg, 17.58%) como un vidrio de color naranja. <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO, 30 °C) 1.27 (3H, d), 1.43 - 1.55 (6H, m), 3.51 (1H, d), 3.72 (1H, dd), 3.96 (1H, dd), 4.18 - 4.32 (1H, m), 4.67 (1H, s), 6.59 (1H, s), 7.09 - 7.3 (2H, m), 7.42 (1H, t), 7.52 - 7.73 (3H, m), 7.78 (1H, d), no se observó el NH. HRMS (ESI): [M+H]<sup>+</sup>, experimental 441.17831, C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere 441.17844.

20

25

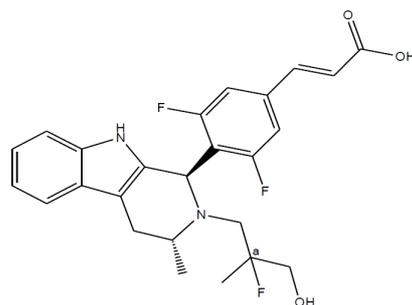
30

#### Preparación de (E)-3-[3,5-difluoro-4-[2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-2-io-1-il]fenil]prop-2-enoato



Se disolvió el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico (0.500 g, 1.13 mmol) en DMSO (10 mL) y se calentó a 120 °C en aire y luz durante 16 h. A continuación, se calentó a 180 °C durante 2.5 h. La mezcla de reacción se enfrió y se purificó por HPLC preparativo (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 μ de sílice, 50 mm de diámetro, 100 mm de longitud), utilizando mezclas con una polaridad decreciente de agua (que contenía un 1% de NH<sub>3</sub>) y MeCN como eluyentes. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron hasta sequedad para obtener (*E*)-3-[3,5-difluoro-4-[2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-ilo-1-il]fenil]prop-2-enoato (0.047 g, 9.40%) como un sólido naranja. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) 1.27 (3H, s), 1.33 (3H, d), 3.09 (3H, s), 4.59-4.8 (1H, m), 5.14-5.37 (1H, m), 6.54 (1H, d), 7.19 (1H, d), 7.39 (1H, t), 7.63 (2H, d), 7.74 (1H, t), 7.91 (1H, d), 8.45 (1H, d), 8.88 (1H, s), 10.79 (1H, s). m/z: ES+[M+H]<sup>+</sup> 439.

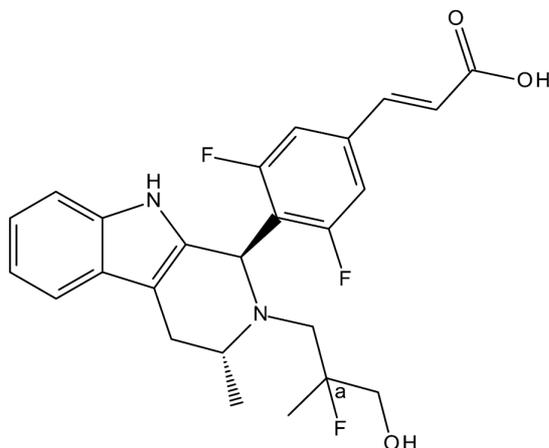
**Ejemplo 14A: preparación del ácido (*E*)-3-[3,5-difluoro-4-[(1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-1,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-*b*]indol-1-il]fenil]prop-2-enoico (Isómero 1)**



a = configuración absoluta desconocida  
ISÓMERO 1

Se añadió hidróxido de sodio 2 M (1.27 mL, 2.54 mmol) a una solución de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato – Isómero 1 (120 mg, 0.25 mmol) en THF (0.635 mL)/metanol (0.635 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se diluyó con EtOAc y agua. El pH de la fase acuosa se ajustó hasta un pH de 6 mediante la adición de HCl 2 M y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con EtOAc, a continuación las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de MeOH en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico – Isómero 1 (85 mg, 72.9%) como un sólido de color beis. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) 0.97 (3H, d), 1.05 (3H, d), 2.32 - 2.4 (1H, m), 2.44 - 2.54 (1H, m), 2.73 - 2.93 (3H, m), 3 - 3.14 (2H, m), 3.32 - 3.49 (2H, m), 4.73 (1H, s), 5.14 (1H, s), 6.58 (1H, d), 6.82 - 6.96 (2H, m), 7.10 (1H, d), 7.33 (1H, d), 7.36 (1H, d), 7.45 (1H, d), 10.49 (1H, s). m/z (ES<sup>+</sup>), [M+H]<sup>+</sup> = 459.

**Ejemplo 14B: preparación del ácido (*E*)-3-[3,5-difluoro-4-[(1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-1,3,4,9-tetrahidropirido[3,4-*b*]indol-1-il]fenil]prop-2-enoico (Isómero 2)**

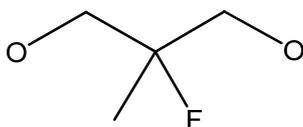


a = configuración absoluta desconocida  
ISÓMERO 2

Se añadió hidróxido de sodio 2 M (1.27 mL, 2.54 mmol) a una solución de (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato – Isómero 2 (110 mg, 0.23 mmol) en THF (0.529 mL)/metanol (0.529 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y a continuación se diluyó con EtOAc y agua. El pH de la fase acuosa se ajustó hasta un pH de 6 mediante la adición de HCl 2 M y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con EtOAc, a continuación las fases orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de MeOH en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato – Isómero 2 (81 mg, 76%) como un sólido de color beis. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO, 27 °C) 1.02 (2H, s), 1.05 (3H, d), 1.23 (1H, s), 1.90 (3H, s), 2.28 – 2.46 (1H, m), 2.53 – 2.7 (1H, m), 2.86 – 3.03 (2H, m), 3.56 (1H, d), 4.83 (1H, s), 5.17 (1H, s), 6.66 (1H, d), 6.86 – 7.08 (2H, m), 7.17 (1H, d), 7.40 (1H, d), 7.44 (2H, d), 7.53 (1H, d), 10.54 (1H, s). m/z (ES<sup>+</sup>), [M+H]<sup>+</sup> = 459.

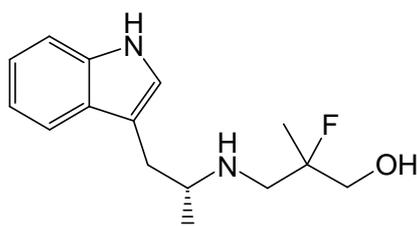
El (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (Isómeros 1 y 2) utilizado como material de partida se preparó como se indica a continuación:

### 2-Fluoro-2-metilpropano-1,3-diol



Se añadió LiAlH<sub>4</sub> (0.741 g, 19.25 mmol) en porciones a una solución enfriada de 2-fluoro-2-metilmalonato de dietilo (1.345 g, 7.00 mmol) en THF (35.0 mL). Se permitió que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente durante 1 h. Después de enfriar hasta 0 °C, la reacción se desactivó mediante la adición de agua (0.75 mL), NaOH al 15% (0.75 mL) y a continuación agua (1.5 mL). La suspensión se agitó durante 30 min, a continuación se filtró y el sólido se lavó con THF. El filtrado se evaporó para proporcionar 2-fluoro-2-metilpropano-1,3-diol (0.745 g, 98%) como un aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) 1.34 (3H, d), 2.12 - 2.27 (2H, m), 3.75 (4H, d).

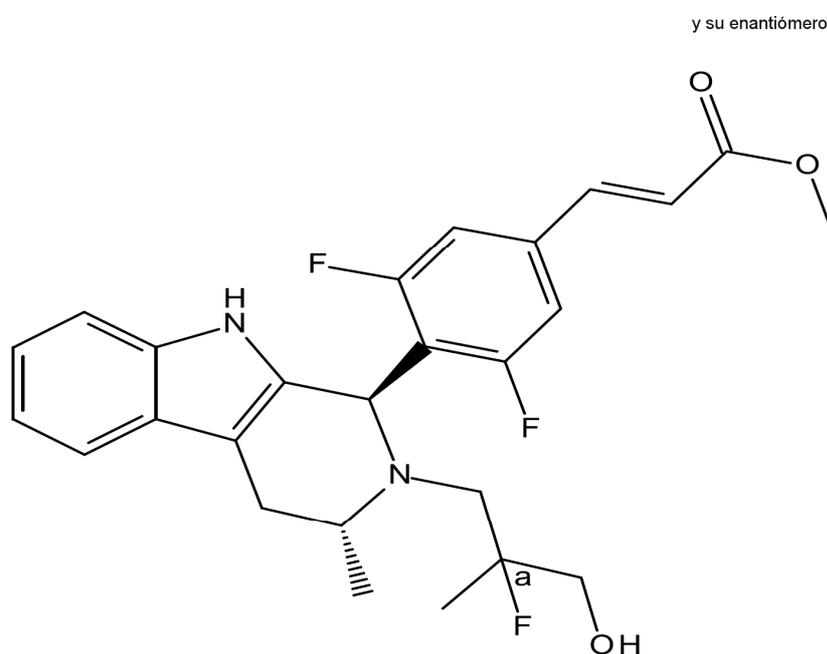
### 3-(((*R*)-1-(1*H*-Indol-3-il)propan-2-il)amino)-2-fluoro-2-metilpropan-1-ol



35

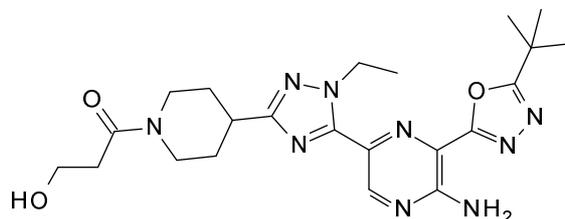
Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (1.151 mL, 6.80 mmol) a una solución de 2-fluoro-2-metilpropano-1,3-diol (0.70 g, 6.47 mmol) en DCM (17.85 mL) a 0 °C y a continuación se añadió 2,6-lutidina (0.908 mL, 7.77 mmol). Se permitió que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente durante 30 min y a continuación se lavó con HCl 2 M. Se hizo pasar la fase orgánica a través de un cartucho de separación de fases y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en dioxano (12 mL), a continuación se añadieron (*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina (1.128 g, 6.47 mmol) y DIPEA (1.678 mL, 9.71 mmol) y la reacción se calentó hasta 90 °C durante 2 h. Después de enfriar, la reacción se diluyó con DCM y se lavó con agua. La fase acuosa se extrajo con DCM y a continuación las fases orgánicas se concentraron al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 10% de MeOH en DCM. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar 3-(((*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)amino)-2-fluoro-2-metilpropan-1-ol (0.815 g, 47.6%) como un producto pegajoso de color marrón. m/z (ES+), [M+H]<sup>+</sup> = 265.

15 **(*E*)-3-(3,5-Difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (Isómeros 1 y 2)**



a = configuración absoluta desconocida  
ISÓMEROS 1 y 2

20 Se añadió (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-formilfenil)acrilato de metilo (565 mg, 2.50 mmol) a una suspensión de 3-(((*R*)-1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-il)amino)-2-fluoro-2-metilpropan-1-ol (661 mg, 2.50 mmol) en tolueno (11.3 mL)/ácido acético (1.25 mL). La reacción se calentó hasta 90 °C durante 5 h. Después de enfriarla, los componentes volátiles se eliminaron al vacío y después se hizo pasar el residuo a través de una columna SCX-2, eluyendo con metanol para eliminar el aldehído que no había reaccionado. A continuación, la columna se eluyó con NH<sub>3</sub>/MeOH para liberar los productos. El filtrado básico se evaporó y a continuación el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 0 hasta un 50% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (Isómero 1 - 122 mg, 10.3%) como un sólido de color amarillo y (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-3-hidroxi-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrilato de metilo (Isómero 2 - 129 mg, 11%) como un sólido de color amarillo/naranja. Isómero 1 - <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) 1.10 (3H, d), 1.14 (3H, d), 2.54 (1H, dd), 2.62 - 2.73 (1H, m), 3.06 - 3.3 (2H, m), 3.40 (1H, dd), 3.56 (1H, t), 3.80 (3H, s), 3.87 - 4.08 (1H, m), 4.27 (1H, s), 5.16 (1H, s), 6.37 (1H, d), 7.01 (2H, d), 7.07 - 7.15 (2H, m), 7.14 - 7.24 (1H, m), 7.42 - 7.56 (2H, m), 7.71 (1H, s). m/z (ES+), [M+H]<sup>+</sup> = 473. Isómero 2 - <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 27 °C) 1.15 (3H, d), 1.20 (3H, d), 2.65 (1H, dd), 2.79 (1H, t), 2.93 - 3.09 (2H, m), 3.57 (1H, dt), 3.70 (1H, dd), 3.78 (3H, s), 4.2 - 4.67 (1H, m), 5.42 (1H, s), 6.32 (1H, d), 6.94 (2H, d), 7.06 - 7.15 (2H, m), 7.19 - 7.27 (2H, m), 7.42 (1H, s), 7.51 (1H, dd), 8.02 (1H, s). m/z (ES+), [M+H]<sup>+</sup> = 473.

**Ejemplo de referencia 1: 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona**

5

Se añadió 4-metilbencenosulfonato de piridina (11.62 g, 46.24 mmol) a una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)propan-1-ona (128 g, 231.19 mmol) en metanol (1 L) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 60 °C durante 1.5 horas. La mezcla se solubilizó después de 5 minutos. La mezcla se mantuvo a 50 °C durante toda la noche y en este tiempo se formó un precipitado. El material sólido se aisló mediante filtración y se lavó con agua y acetonitrilo. Este material aún contenía impurezas minoritarias de la etapa previa y requirió una purificación adicional. El material se disolvió en diclorometano y se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (desde un 0% de metanol/DCM hasta un 10% de metanol/DCM). El producto deseado, 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (Ejemplo de referencia 1) (92 g, 85%) se aisló de este modo como un sólido de color crema (Forma A): Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.4 – 1.51 (12H, m), 1.51 – 1.78 (2H, m), 1.89 – 2.05 (2H, m), 2.72 – 2.86 (1H, m), 2.91 – 3.05 (1H, m), 3.12 – 3.24 (1H, m), 3.64 (2H, c), 3.83 – 4.01 (1H, m), 4.29 – 4.41 (1H, m), 4.47 (1H, t), 4.58 (2H, c), 8.26 (2H, s), 8.85 (1H, s); Espectro de masas [M+H]<sup>+</sup> = 470.

20 La 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)propan-1-ona se preparó como se indica a continuación:

Se añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (76 mL, 511.14 mmol) a una suspensión de 4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (150 g, 319.46 mmol) en 2-metil-THF (1.2 L). Se añadió yodoetano (46 mL, 575.03 mmol) y la mezcla se agitó durante 16 horas a 35 °C. Se añadió más yodoetano (46 mL, 575.03 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (76 mL, 511.14 mmol) y se continuó agitando durante 24 horas a 35 °C. La mezcla se vertió sobre agua y el material insoluble se aisló mediante filtración, se lavó con agua y MTBE y se secó al vacío para proporcionar 4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (116 g, 73.0%) como un sólido amarillo. El filtrado se extrajo con DCM y la solución orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en columna de sílice utilizando una elución en gradiente (desde un 30% de MTBE/heptano hasta un 100% de MTBE). De este modo, se aisló un segundo lote del producto deseado (12 g, 24.12 mmol, 7.55%) como un sólido amarillo, el cual se combinó posteriormente con el primer lote: Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.41 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.48 (3H, t), 1.52 – 1.69 (2H, m), 1.87 – 2.04 (2H, m), 2.79 – 3.03 (3H, m), 3.86 – 4.03 (2H, m), 4.59 (2H, c), 7.89 (2H, s), 8.85 (1H, s); Espectro de masas [M+H]<sup>+</sup> = 498.

Una suspensión de 4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (3009.5 g, 6.05 mol) en DCM (9 L) se enfrió hasta 5-10 °C en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se añadió TFA (9 L) en porciones a la suspensión, a la vez que se mantenía la temperatura < 30 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se concentró, el residuo resultante se disolvió en agua (30 L) y se añadió lentamente a una solución acuosa de amoníaco al 35% (12 L) a 0-5 °C. La suspensión se agitó durante 30 min y a continuación el producto se separó por filtración y se lavó con agua (2 x 6 L). El producto se secó a 50 °C al vacío durante 2 días para proporcionar 3-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1*H*-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (2496 g): Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.4 – 1.52 (12H, m), 1.57 – 1.73 (2H, m), 1.83 – 1.93 (2H, m), 2.57 – 2.7 (2H, m), 2.71 – 2.84 (1H, m), 2.96 – 3.09 (2H, m), 4.58 (2H, c), 8.06 (2H, s), 8.84 (1H, s); Espectro de masas [M+H]<sup>+</sup> = 398.

A una solución del ácido 3-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)propanoico (HATU, 48.80 g, 0.2774 mol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (86.96 mL, 0.4993 mol) en THF (552 mL), se añadió hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (115.73 g, 0.3051 mol) en porciones a TA en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 20 min y a continuación se añadió en porciones 3-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1*H*-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (122.5 g (110.25 g de principio activo), 0.2774 mol) durante 1 h. Después de 3.5 h, la mezcla se concentró y el residuo se suspendió en MeCN (275 mL) durante 15 min a temperatura ambiente. El producto se separó por filtración, se lavó con MeCN (3 x 110 mL) y se secó durante toda la noche a 50 °C al vacío. Esto proporcionó 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)propan-1-ona (131.9 g, 96%). Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.29 – 1.48 (16H, m), 1.48 – 1.75 (4H, m), 1.83 – 1.99 (2H, m),

2.48 – 2.68 (2H, m), 2.68 – 2.79 (1H, m), 2.87 – 2.99 (1H, m), 3.07 – 3.19 (1H, m), 3.32 – 3.42 (1H, m), 3.47 – 3.6 (1H, m), 3.64 – 3.75 (1H, m), 3.75 – 3.84 (1H, m), 3.84 – 3.95 (1H, m), 4.24 – 4.39 (1H, m), 4.47 – 4.6 (3H, m), 7.84 (2H, s), 8.79 (1H, s): Espectro de masas [M+Na]<sup>+</sup> = 577.

#### 5 Preparación alternativa del Ejemplo de referencia 1

10 A una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)propan-1-ona (131.9 g, 0.2382 mol) en metanol (1045 mL), se añadió *p*-toluenosulfonato de piridinio (11.97 g, 47.7 mmol) en atmósfera de N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 5.5 h y a continuación a 50 °C durante toda la noche. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C y el sólido se separó por filtración. El producto se suspendió en agua (250 mL) durante 20 min a temperatura ambiente, se separó por filtración, se lavó con agua (3x40 mL) y se secó a 50 °C al vacío. Esto proporcionó 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (21.4 g) como la Forma A (remítase más adelante).

15 Las aguas madre de metanol se concentraron y el sólido resultante se suspendió en agua (0.6 L) durante 20 min a temperatura ambiente. El sólido se aisló por filtración y se lavó con agua (3x100 mL). La masa húmeda retenida sobre el filtro se suspendió por segunda vez en agua (0.5 L) durante 20 minutos más. El producto se aisló por filtración, se lavó con agua (100 mL) y se secó a 50 °C al vacío. Esto proporcionó 81.9 g de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (81.9 g) como la Forma A.

20 Ambos lotes se combinaron (103.3 g), se les añadió un núcleo de cristalización de la Forma B (16.68 g) y se suspendieron en MeCN (826 mL) a temperatura ambiente durante toda la noche. Esto proporcionó 117.4 g de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona como un sólido de color amarillo pálido (117.4 g), Forma B (remítase más adelante). Este material se purificó adicionalmente suspendiéndolo en heptano (7.5 vol. rel.) durante 1 hora. La mezcla se filtró, se secó por succión sobre el filtro y se secó a 50 °C en un horno de vacío durante toda la noche para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (102.5 g) como la Forma B.

25 La Forma B también se puede preparar suspendiendo la Forma A en MeCN sin añadir ningún núcleo de cristalización.

35 La Forma A o B también se puede convertir en la Forma C como se indica a continuación:

40 Una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (p. ej., la Forma B preparada mediante los procesos expuestos anteriormente) en IPA (12 vol.) se calentó a reflujo hasta que el sólido se disolvió. La solución se filtró en caliente y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. Esto proporcionó 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona como un sólido de color amarillo pálido (99.3 g, 97%) como la Forma C.

45 La Forma C también se puede convertir en la Forma B como se indica a continuación:

50 En un recipiente con reborde de 10 L, se calentó la Forma C (porción 1 de 377.8 g) en MIBK (7900 mL) hasta 110-115 °C para obtener una solución. Se dejó que la solución se enfriara hasta 97-103 °C y se sometió inmediatamente a una filtración de pulido en un recipiente de 50 L que contenía un núcleo de cristalización de la Forma B (0.8 g) en acetonitrilo (8220 mL) agitándose a -15 °C. Durante la adición, la temperatura en el recipiente de 50 L se mantuvo entre -15 y 25 °C mediante la refrigeración de la camisa. Se añadieron tres porciones más del compuesto disuelto en MIBK mediante un método similar. Se añadió un núcleo de cristalización de la Forma B (0.8 g) a la suspensión resultante y la mezcla se agitó a continuación a 10-20 °C durante toda la noche. El análisis *in situ* confirmó la presencia de la forma deseada (Forma B) sin la Forma C ni la forma amorfa visibles. La mezcla se filtró y se lavó con acetonitrilo (3340 mL). El sólido se secó en un horno durante 2 días (el sólido se disgregó durante el proceso de secado y se obtuvo un polvo y una mezcla de pequeños agregados con un tamaño de ~1 mm a ~3-4 mm) hasta que se obtuvo un peso constante. Rendimiento = 1532.8 g (93.5%).

55 El ácido 3-(tetrahydro-2*H*-piran-2-iloxi)propanoico se preparó como se indica a continuación:

60 A una solución agitada de metanol (2.4 L) y ácido sulfúrico concentrado (44.4 mL, 832.61 mmol) a 0 °C en atmósfera de nitrógeno, se añadió, gota a gota, beta-propiolactona (175 mL, 2.78 mol). Se dejó que esta solución se agitara a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se enfrió hasta 10 °C antes de añadir, en porciones, bicarbonato de sodio (145 g, 1.72 mol) y se dejó que la suspensión resultante se agitara a temperatura ambiente durante 75 minutos. Esta solución se filtró y la masa húmeda retenida sobre el filtro se lavó con metanol (800 mL). El filtrado se evaporó hasta obtener un aceite, el cual se disolvió nuevamente en diclorometano (1.2 L) y se agitó durante 60 minutos antes de volver a filtrarlo. Esta solución se filtró antes de

evaporarla para obtener 3-hidroxiopropanoato de metilo (219 g, 76%) como un aceite. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{CDCl}_3$ ) 2.50 (2H, t), 3.63 (3H, s), 3.78 (2H, t).

5 Se añadió *p*-toluenosulfonato de piridinio (7.65 g, 30.45 mmol) a una solución transparente de 3-hidroxiopropanoato de metilo (63.4 g, 609.00 mmol) y 3,4-dihidro-2*H*-pirano (78 mL, 852.60 mmol) en diclorometano (650 mL) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno para obtener una solución turbia. Se dejó que esto se agitara a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se lavó con agua (250 mL) y salmuera (250 mL) antes de secarla ( $\text{MgSO}_4$ ) y evaporarla hasta obtener un aceite. Este  
10 producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en sílice con un gradiente de elución desde un 15 hasta un 30% de EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron a sequedad para proporcionar 3-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)propanoato de metilo (67.7 g, 59.0%) como un aceite incoloro: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.47 (4H, dddd), 1.55 – 1.84 (2H, m), 2.55 (2H, t), 3.33 – 3.53 (1H, m), 3.53 – 3.7 (4H, m), 3.78 (1H, ddd), 3.93 (1H, dt), 4.42 – 4.72 (1H, m); Espectro de masas  $[\text{MH}]^+ = 189$ .

15 Se añadió hidróxido de sodio (2 M, 349 mL, 697.58 mmol) a una solución de 3-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)propanoato de metilo (67.68 g, 359.58 mmol) en THF (680 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El THF se eliminó al vacío, a continuación la fase acuosa se lavó con acetato de etilo (260 mL), antes de enfriarla hasta 0 °C, y se acidificó cuidadosamente hasta obtener un pH de 5 mediante la adición de ácido clorhídrico (2 M). El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x  
20 250 mL) antes de secarlo ( $\text{MgSO}_4$ ) y evaporarlo para proporcionar el ácido 3-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)propanoico (57.0 g, 91%) como un aceite transparente. Este material se disolvió en acetato de etilo (750 mL) y a continuación se lavó con agua (3 x 250 mL) y salmuera (250 mL) para eliminar el ácido acético remanente. La solución orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó para proporcionar el ácido 3-(tetrahidro-2*H*-piran-2-iloxi)propanoico (45.67g, 72.9%) como un aceite incoloro: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) 1.43 – 1.67 (4H, m), 1.65 – 1.95 (2H, m), 2.68 (2H, t), 3.48 – 3.58 (1H, m), 3.73 (1H, dt), 3.88 (1H, ddd), 4.02 (1H, dt), 4.59 – 4.7  
25 (1H, m); Espectro de masas  $[\text{M-H}]^- = 173$ .

El 4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo se preparó como se indica a continuación:

30 Se añadió hidrazina hidratada (23.59 mL, 480.75 mmol) gota a gota a una mezcla agitada de 3-amino-6-bromopirazin-2-carboxilato de metilo (100 g, 418.04 mmol) en EtOH (2 L). La mezcla se calentó a 50 °C en atmósfera de nitrógeno. La suspensión espesa resultante se agitó a 50 °C durante 16 horas. Se añadió más hidrazina (2.5 mL) en una porción y la suspensión se agitó a 50 °C durante 24 horas más. Se añadió etanol (500  
35 mL) a la mezcla de reacción espesa y se dejó que la mezcla se enfriara hasta temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con etanol (1 L) y se secó al vacío para obtener 3-amino-6-bromopirazin-2-carbohidrazida (98 g, cuantitativo) como un sólido de color crema: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 4.52 (2H, s), 7.59 (2H, s), 8.30 (1H, s), 9.74 (1H, s); Espectro de masas  $[\text{M+H}]^+ = 232$ .

40 Se añadió anhídrido pivalico (165 mL, 815.38 mmol) a una mezcla agitada de 3-amino-6-bromopirazin-2-carbohidrazida (172 g, 741.26 mmol) en acetonitrilo (1.8 L) y la mezcla se calentó a 80 °C durante 1 hora. Se dejó que la reacción se agitara durante 16 horas. El material sólido amarillo requerido se aisló por filtración. El filtrado se repartió entre EtOAc (2 L) y bicarbonato de sodio acuoso (2 L). La fase orgánica se lavó con salmuera saturada y se secó con  $\text{MgSO}_4$ . La solución se filtró y se concentró para obtener un sólido pegajoso de color  
45 naranja, el cual se lavó disgregándolo con MTBE (250 mL). El sólido amarillo insoluble se aisló por filtración y se comprobó que este material era idéntico al primer sólido. Los sólidos combinados se secaron en el horno de vacío a 50 °C durante 3 días para proporcionar 3-amino-6-bromo-*N*'-pivaloilpirazin-2-carbohidrazida (224 g, 96%) como un sólido amarillo: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 1.17 (9H, s), 7.62 (2H, s), 8.37 (1H, s), 9.42 – 9.56  
50 (1H, m), 10.09 – 10.23 (1H, m); Espectro de masas  $[\text{M+H}]^+ = 318$ .

A la 3-amino-6-bromo-*N*'-pivaloilpirazin-2-carbohidrazida (2301 g, 7.28 mol) en MeCN (10.8 L), se añadió DIPEA (3.044 L, 17.48 mol) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (1665 g, 8.73 mol) en porciones (~280 g x 6) a 50 °C durante un periodo de 30 min. La temperatura de reacción se mantuvo entre 65 y 70 °C controlando la tasa de adición. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta  
55 temperatura ambiente y se desactivó con  $\text{NaHCO}_3$  al 5% (acuoso, 24.2 L). La suspensión resultante se agitó durante 30 min y a continuación se filtró. El producto se lavó con agua (14.8 L), se secó por succión y se secó a 50 °C durante 16 h. El producto se disolvió en DCM (12 L) y se separaron las fases. La fase orgánica se introdujo en un lecho de sílice (6 kg) y el producto se eluyó con un 20% de EtOAc/DCM (8 x 10 L). Al concentrar las fracciones que contenían el producto, se obtuvieron 1987 g (92% de rendimiento) con una pureza de un 99.8% por HPLC de 5-bromo-3-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (36 g, 17%): Espectro de  $^1\text{H}$  RMN: ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 1.43 (9H, s), 7.70 (2H, s), 8.39 (1H, s); Espectro de masas  $[\text{M+H}]^+ = 298$ .

65 Se hizo pasar una corriente de nitrógeno gaseoso a través de una solución de 5-bromo-3-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (89.35 g, 239.75 mmol) en DMA (1.2 L) durante 20 minutos. Se añadieron secuencialmente dicitohexil(2',4',6'-triisopropilbifenil-2-il)fosfina (11.43 g, 23.98 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (5.49 g, 5.99 mmol), zinc (1.568 g, 23.98 mmol) y dicianozinc (16.89 g,

143.85 mmol) a la mezcla agitada. La mezcla se calentó hasta 100 °C y se agitó durante 1 hora. La mezcla se enfrió y se repartió entre DCM (3 L) y agua (1 L). La mezcla negra se filtró a través de celite y se separó la fase orgánica. La solución se lavó con agua y después con salmuera. La solución se secó con sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. El residuo se lavó disgregándolo con MTBE, se aisló por filtración y se lavó con MTBE. La masa húmeda retenida sobre el filtro se secó al vacío para proporcionar 5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-carbonitrilo (55.7 g, 95%) como un sólido de color naranja pálido: Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.46 (9H, s), 6.02 (1H, s), 8.38 (2H, s); Espectro de masas [M-H]<sup>-</sup> = 242.

Se añadió hidrazina hidratada (82 mL, 1.69 mol) a 5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-carbonitrilo (55 g, 225.18 mmol) en IPA (200 mL) y la mezcla se calentó a 50 °C en atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. La mezcla se enfrió en un baño de hielo. El precipitado resultante se recolectó por filtración, se lavó con IPA y éter dietílico y se secó hasta obtener un peso constante para proporcionar (*Z*)-5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-carbohidrazonamida (49.2 g, 79%) como un sólido amarillo: Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 5.26 (2H, s), 5.58 (2H, s), 7.56 (2H, s), 8.75 (1H, s); Espectro de masas [M+H]<sup>+</sup> = 277.

Se añadió hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (74.3 g, 195.44 mmol) a una solución de ácido *N*-Boc-isonipecótico (41.1 g, 179.15 mmol) y 4-metilmorfolina (35.9 mL, 325.74 mmol) en DMA (800 mL). La mezcla se agitó durante 10 minutos y a continuación se añadió (*Z*)-5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-carbohidrazonamida (45 g, 162.87 mmol) a la solución en una porción (se observó una reacción exotérmica desde 22 °C hasta 27 °C). Después de unos minutos, el producto cristalizó en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se retiró del recipiente y se filtró a través de una placa sinterizada. Se añadió más DMA para lavar el producto de las paredes del recipiente (150 mL) y esto se vertió sobre la masa húmeda retenida sobre el filtro. Se añadió isopropanol (600 mL) al recipiente y el resto del producto en el recipiente se suspendió en este disolvente utilizando agitación enérgica. La suspensión en isopropanol se utilizó para lavar la masa húmeda retenida sobre el filtro una vez que la DMA se había eliminado por succión. La masa húmeda retenida sobre el filtro se secó por succión, a continuación se lavó con MTBE y se secó por succión una vez más. La masa húmeda retenida sobre el filtro se secó al vacío para proporcionar (*Z*)-4-(2-(amino(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)metileno)hidrazinocarbonil)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (76 g, 95%) como un sólido amarillo: Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.40 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.63 - 1.9 (2H, m), 2.33 - 2.6 (2H, m, se solapa con la señal del DMSO), 2.63 - 3.03 (2H, m), 3.18 - 3.48 (4H, m, se solapa con la señal del agua), 3.88 - 4.11 (2H, m), 6.43 (2H, s), 7.76 (2H, a), 8.84 (0.5H, s), 8.87 (0.5H, s), 9.85 (1H, s); Espectro de masas [M+H]<sup>+</sup> = 488.

En una preparación alternativa, el ácido *N*-Boc-isonipecótico se puede preparar *in situ* como se indica a continuación:

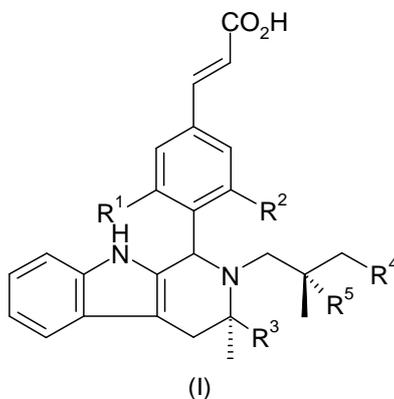
Se disolvió el ácido isonipecótico (858 g, 3.74 mol) en DMA (25.3 L) y se añadió 4-metilmorfolina (393 mL, 3.74 mol). Se agitó durante 5 min y se añadió cloroformiato de isobutilo (489 mL, 3.74 mol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 h y se enfrió hasta 15 °C antes de añadir (*Z*)-5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-carbohidrazonamida (940 g, 3.4 mol) en porciones durante 10 min. La mezcla de reacción se agitó durante 1-2 h a 15 °C. Se añadió agua (20.5 L) en porciones durante 1 h y se agitó durante 1 h más antes de filtrar. A continuación, la masa húmeda retenida sobre el filtro se lavó con agua (4 x 4 L) y se secó por succión sobre el filtro antes de secarla en un horno de vacío a 50 °C hasta que estuviera seca para obtener el producto deseado.

Se añadió ácido acético (200 mL) a dioxano (500 mL) en un recipiente con doble camisa fijo de 3L y la solución se calentó hasta 70 °C en atmósfera de nitrógeno. Se añadió (*Z*)-4-(2-(amino(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)metileno)hidrazinocarbonil)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (74.5 g, 152.80 mmol) en porciones a la mezcla caliente. Después de 10 minutos, la temperatura se incrementó hasta 100 °C (reflujo suave). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 1.5 horas (suspensión) y a continuación se mantuvo a 80 °C durante toda la noche (se formó una solución después de mantener estas condiciones durante toda la noche). La solución resultante se concentró a presión reducida, a continuación se diluyó con tolueno, se evaporó a sequedad, se le añadió tolueno y se volvió a concentrar. El aceite residual se mezcló con un poco de acetato de etilo y se concentró a sequedad. Cristalizó un sólido en la solución, el cual se lavó disgregándolo con MTBE (200 mL) y se aisló por filtración. La masa húmeda retenida sobre el filtro se lavó con agua y MTBE para proporcionar 4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1*H*-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (50 g, 70%) como un sólido gris.

El filtrado se concentró a presión reducida para obtener un sólido amarillo. Este material se lavó disgregándolo con MTBE y se filtró. La masa húmeda retenida sobre el filtro se lavó con acetato de etilo y después con MTBE para obtener un segundo lote como un sólido de color amarillo pálido (4.93 g, 7%). Este material resultó ser idéntico al primer lote: Espectro de <sup>1</sup>H RMN: (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1.17 (9H, s), 1.22 (9H, s), 1.29 - 1.47 (2H, m), 1.67 - 1.78 (2H, m), 2.57 - 2.87 (3H, m), 3.57 - 3.92 (2H, m), 7.56 (2H, a), 8.56 (1H, s), 13.47 (2H, s a); Espectro de masas [M+H]<sup>+</sup> = 470.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I)



5

donde:

10  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno independientemente H o F;

$R^3$  es H o metilo; y

o bien:

15

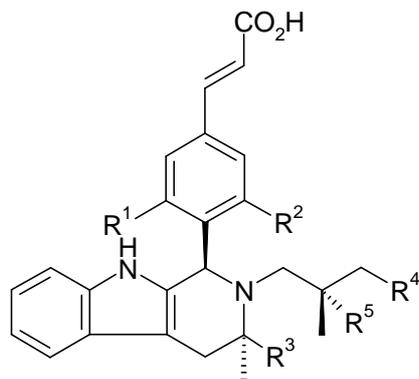
a)  $R^4$  es H y  $R^5$  es F; o

b)  $R^4$  es F y  $R^5$  es H;

20

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

2. Un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde el compuesto es un compuesto de Fórmula (IA).



25

3. Un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable, donde  $R^3$  es hidrógeno.

30

4. Un compuesto según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde  $R^4$  es hidrógeno y  $R^5$  es fluoro.

35

5. Un compuesto según se reivindica en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde el compuesto se selecciona entre:

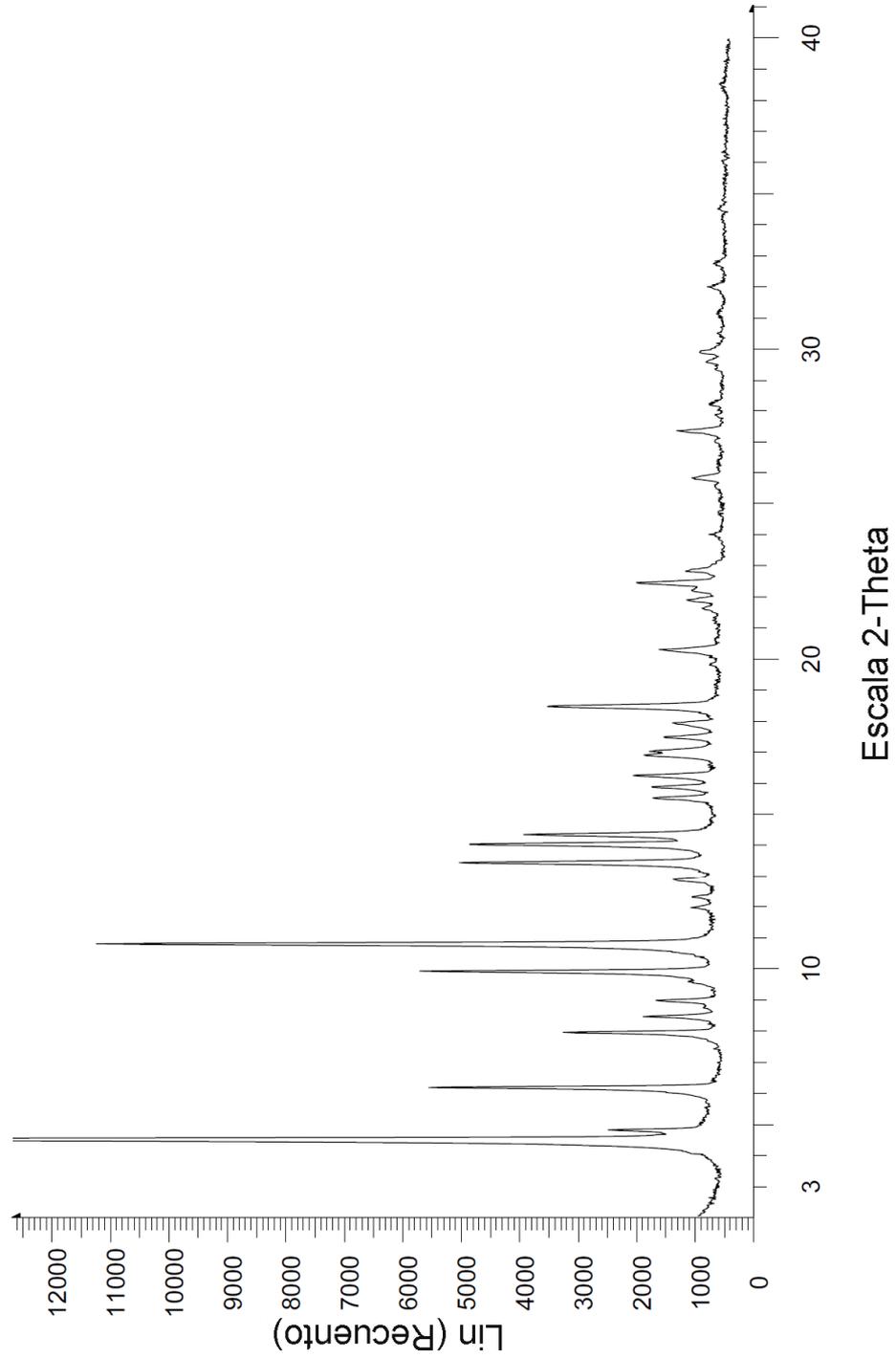
ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;

40

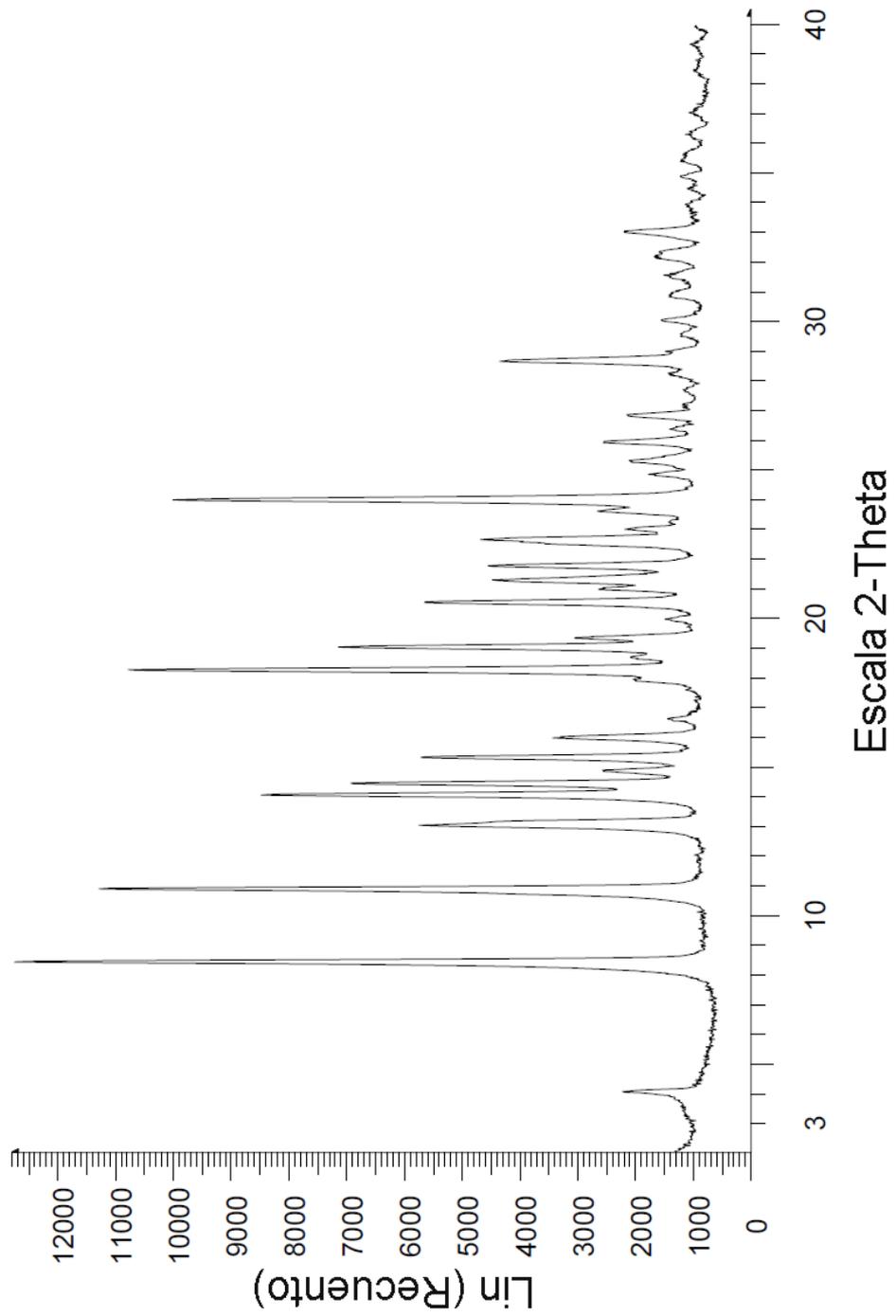
ácido (*E*)-3-(4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico;



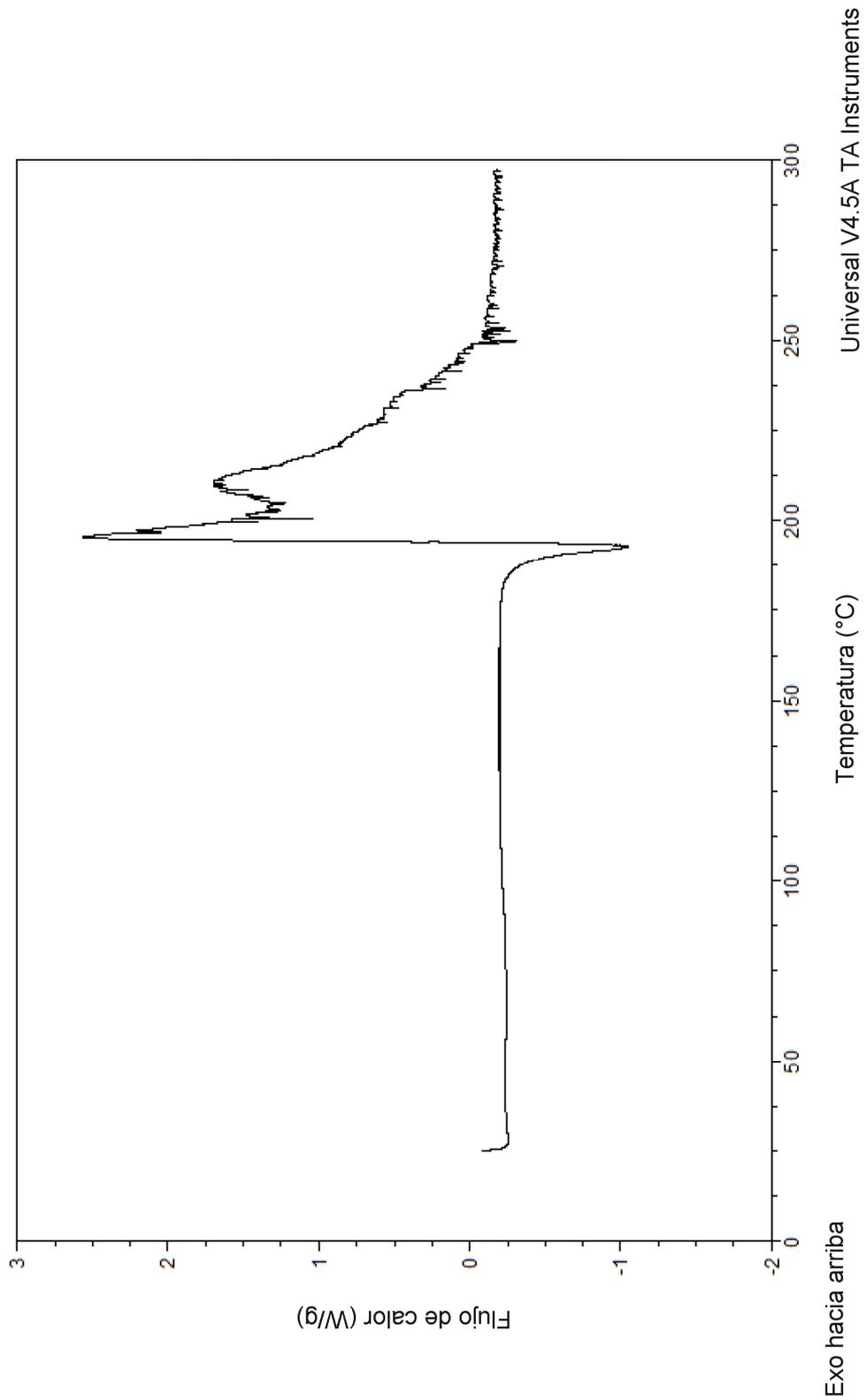
12. Un compuesto para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer, según se reivindica en la reivindicación 11, el cual es el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este.
- 5 13. Un compuesto para su uso en el tratamiento del cáncer, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se reivindica en la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde el cáncer es cáncer de mama o ginecológico.
- 10 14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende el ácido (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*-pirido[3,4-*b*]indol-1-il)fenil)acrílico o una sal farmacéuticamente aceptable de este, asociado con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, donde la composición contiene menos de un 5% p/p de (*R,E*)-3-(3,5-difluoro-4-(2-(2-fluoro-2-metilpropil)-3-metil-4,9-dihidro-3*H*-pirido[3,4-*b*]indol-2-io-1-il)fenil)acrilato.
- 20 16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, donde la composición comprende además un antioxidante y comprende además opcionalmente un agente quelante de metales.



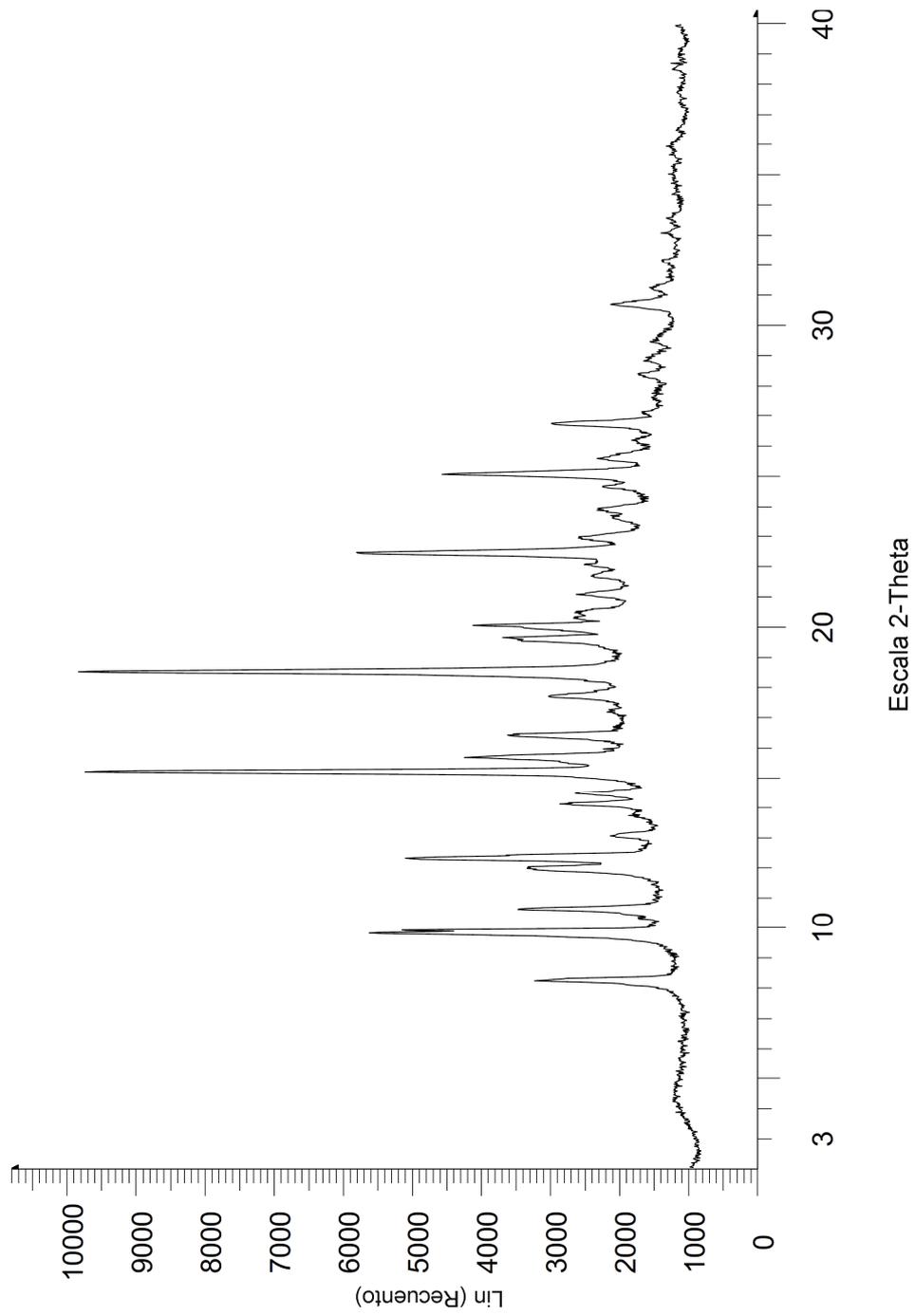
**FIGURA 1 – Curva de DRXP para la Forma A del Ejemplo 7**



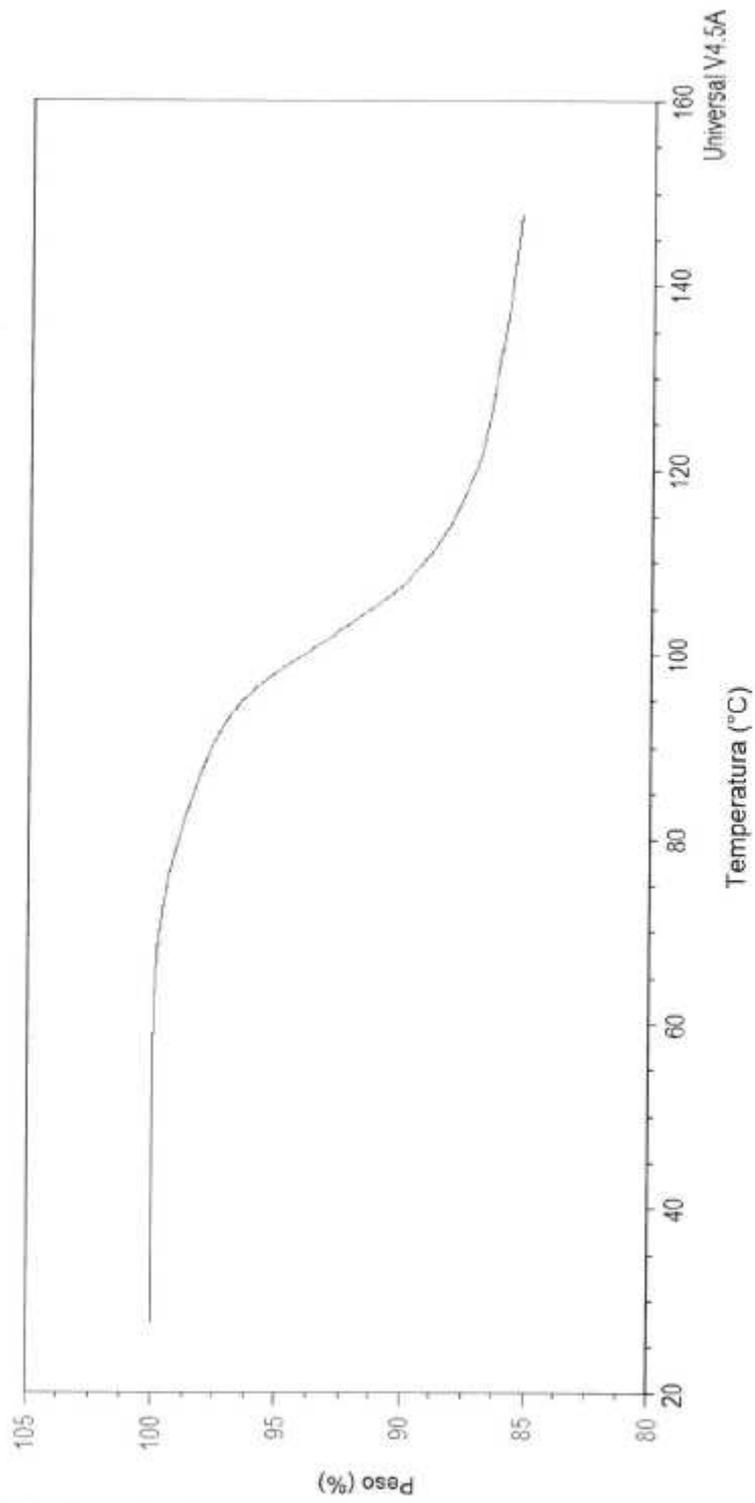
**FIGURA 2 - Patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma B del Ejemplo 1**



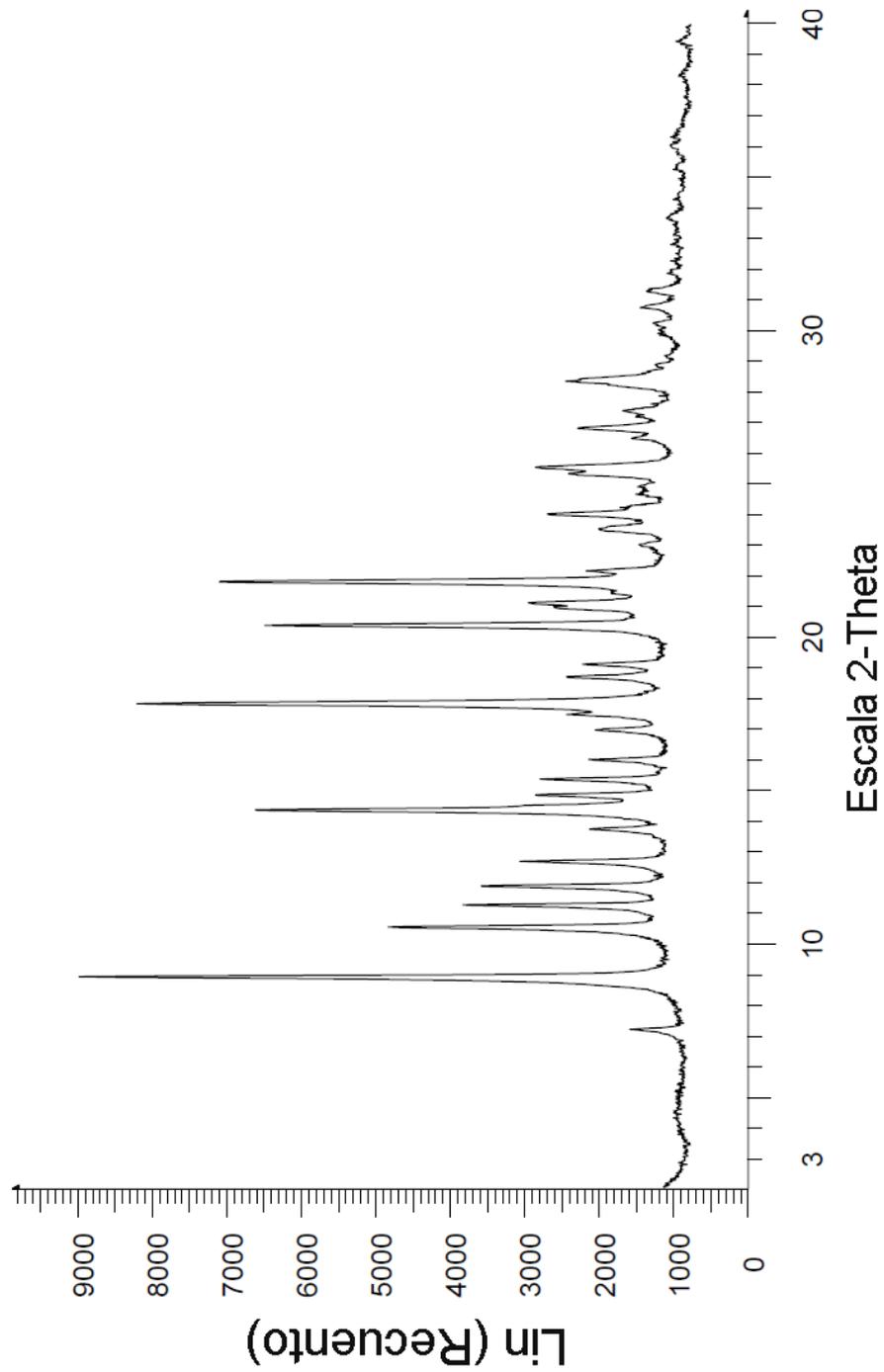
**FIGURA 3 – Termograma de CDB para la Forma B del Ejemplo 1**



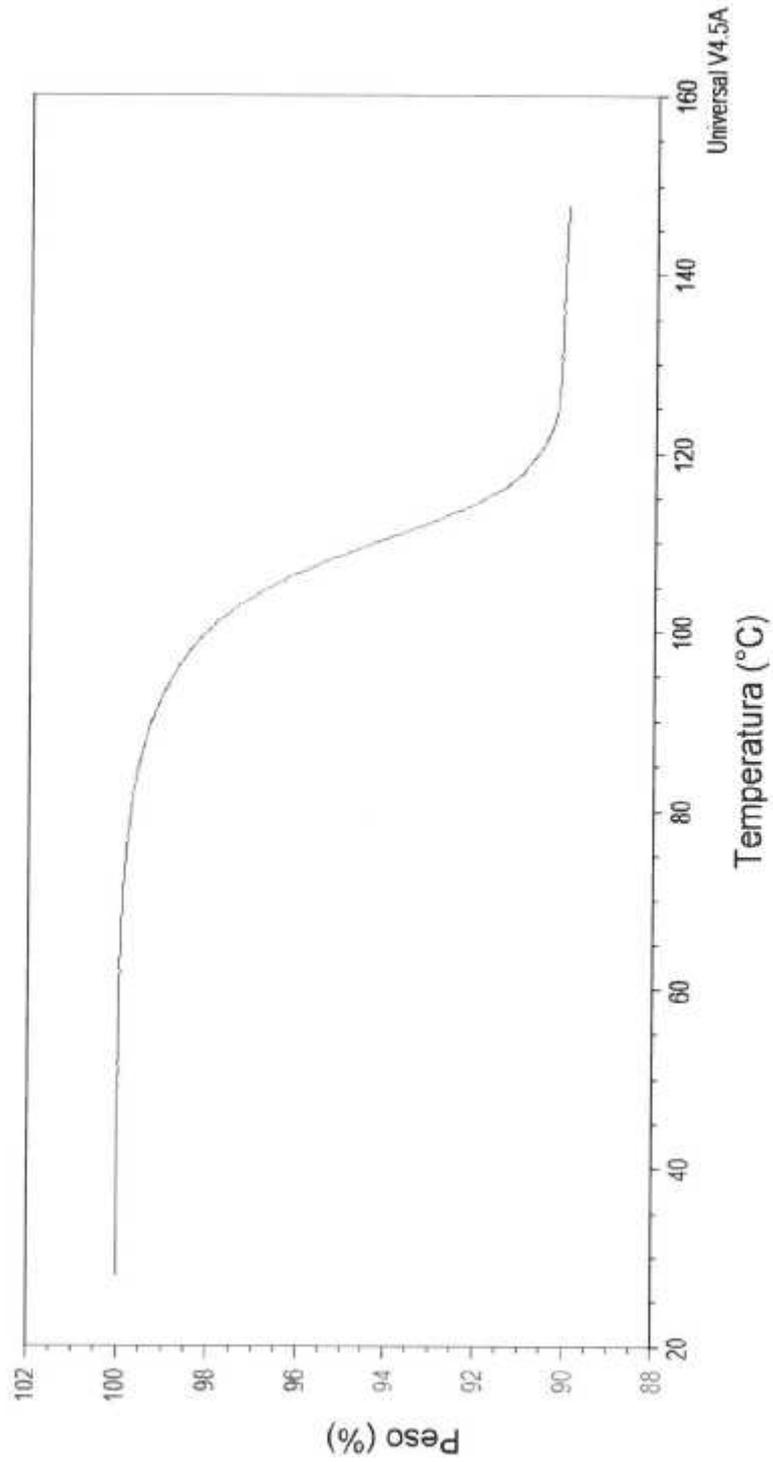
**FIGURA 4: Patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma A del Ejemplo 1**



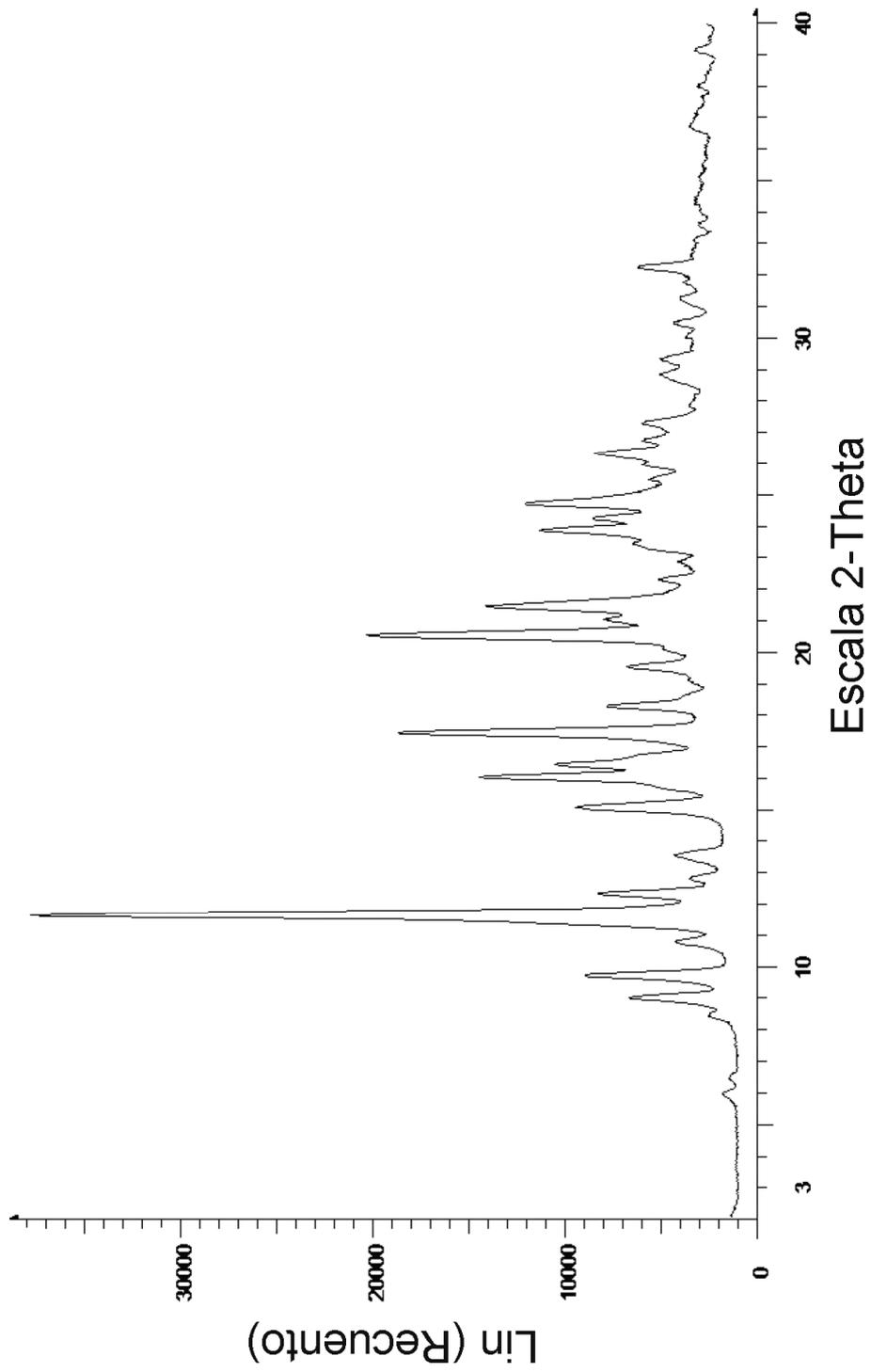
**FIGURA 5: Termograma de ATG para la Forma A del Ejemplo 1**



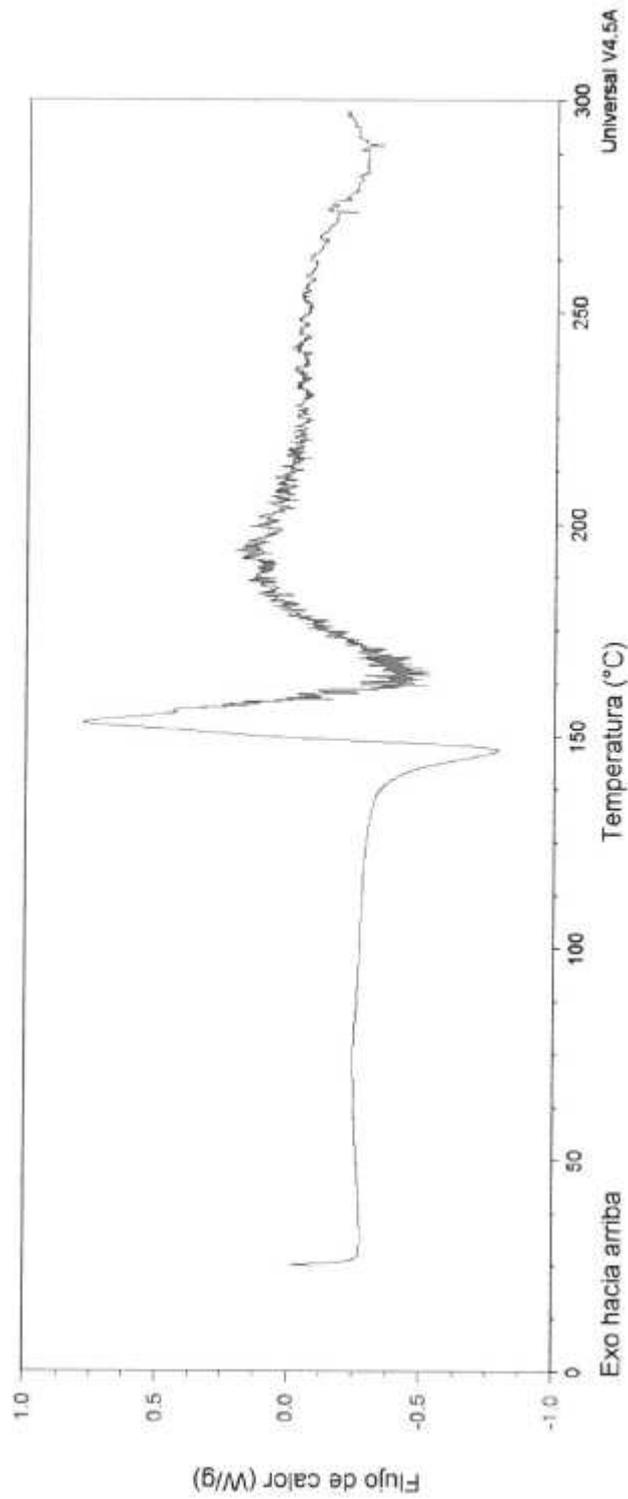
**FIGURA 6: Patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma C del Ejemplo 1**



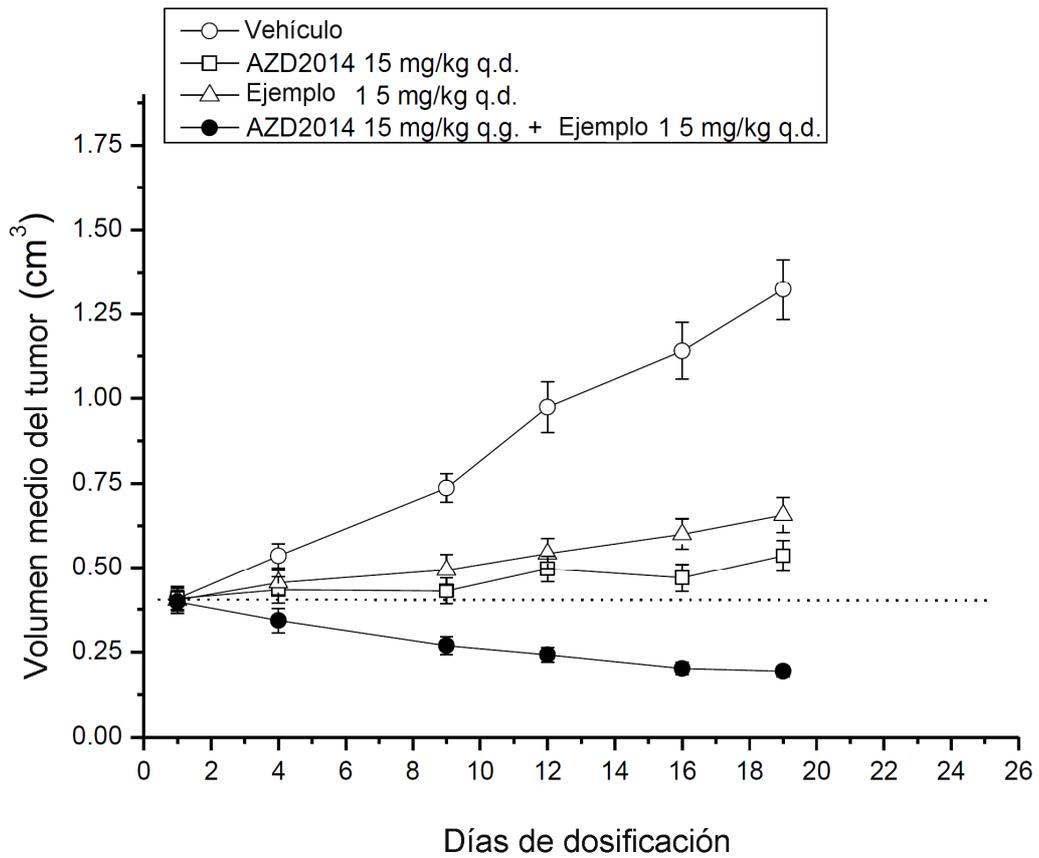
**FIGURA 7: Termograma de ATG para la Forma C del Ejemplo 1**



**FIGURA 8: DRXP del Ejemplo 11**

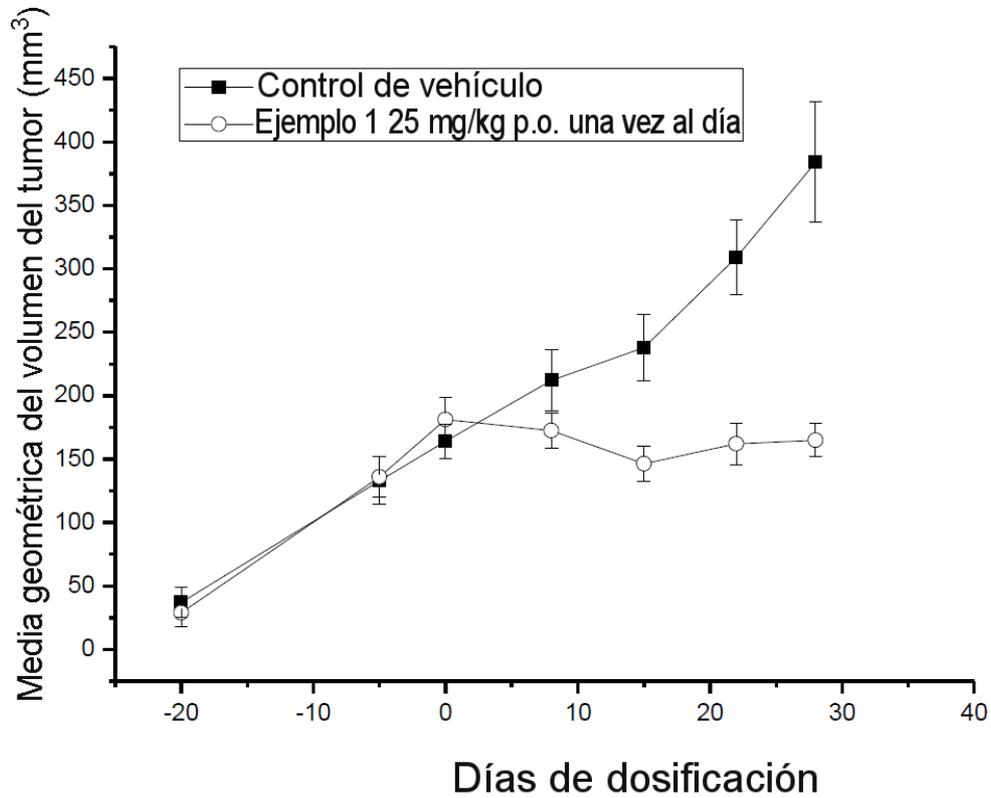


**FIGURA 9: Curva de CDB del Ejemplo 11**



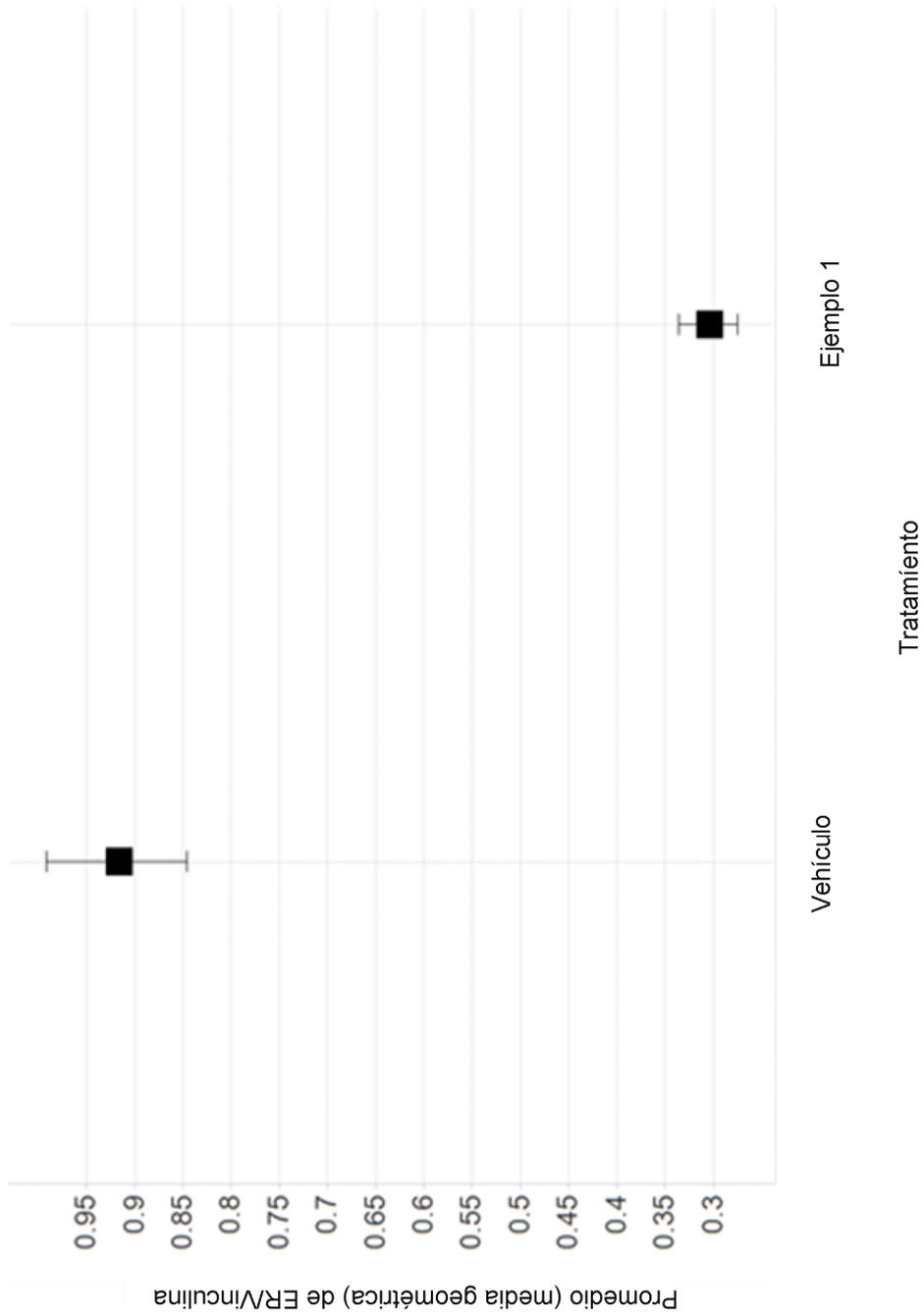
**FIGURA 10: Estudio de xenoinjerto en MCF-7 con el Ejemplo 1 y un inhibidor de mTOR**

Estudio sobre la eficacia de un xenoinjerto de HCC1428 carente de estrógeno durante un periodo prolongado (LTED) con el Ejemplo 1



**FIGURA 11: Estudio sobre la eficacia de un xenoinjerto de HCC1428 carente de estrógeno durante un periodo prolongado (LTED) con el Ejemplo 1**

Niveles de proteína ER en muestras de xenoinjerto *in vivo* de HCC1428 LTED 24 h después de la dosis final del Ejemplo 1



**FIGURA 12: Niveles de proteína ER en muestras de xenoinjerto *in vivo* de HCC1428 LTED 24 h después de la dosis final del Ejemplo 1**