

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 016**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2013 E 16191716 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3184523**

54 Título: **Bromhidrato de N-((4,6-dimetil-2-oxo-L,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[L,1'-bifenil]-3-carboxamida para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular del sistema hematológico**

30 Prioridad:

13.04.2012 US 201261624215 P

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

27.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 745 016 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

5 Bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular del sistema hematológico

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se estima que más de 1.6 millones de personas sean diagnosticadas con cáncer en el 2012. Por ejemplo, el tipo de cáncer más habitual en las mujeres es el cáncer de mama y esta enfermedad es la responsable de una de las tasas de fatalidades más elevadas de todos los cánceres que afectan a las mujeres. El tratamiento actual para el cáncer de mama se limita a una mastectomía total o parcial, terapia de radiación o quimioterapia. Casi 230 000 casos de cáncer en el 2012 serán cáncer de mama, lo que dará como resultado una estimación de 40 000 fallecimientos. Remítase a Siegel *et al.*, *Ca Cancer J Clin* 2012; 62:10-29.

15 Una serie de fallecimientos debidos al cáncer están provocados por cánceres sanguíneos, los cuales incluyen leucemias, mielomas y linfomas. En el 2012, casi 80 000 casos de cáncer serán linfomas, lo que dará como resultado una estimación de 20 000 fallecimientos.

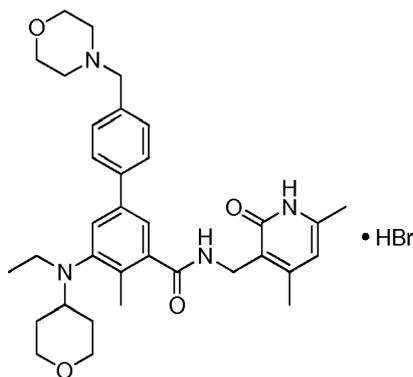
20 La terapia de radiación, quimioterapia y cirugía son los principales métodos de tratamiento para el cáncer. Sin embargo, estas terapias tienen más éxito únicamente cuando el cáncer se detecta en un estadio inicial. Una vez que el cáncer alcanza estadios invasivos/metastásicos, las líneas de células invasoras o células que están experimentando metástasis pueden escapar la detección, lo cual da como resultado recidivas, que requieren el uso de terapia altamente tóxica. En este punto, tanto las células cancerosas como las células no afectadas del paciente se exponen a la terapia tóxica, lo que da como resultado, entre otras complicaciones, un debilitamiento del sistema inmunitario.

En este sentido, sigue siendo necesario en la técnica disponer de métodos nuevos para tratar el cáncer, tal como el cáncer de mama o linfomas, en un paciente.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

35 Por consiguiente, en la presente se describe el bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida:



40 En la presente también se describe un polimorfo particular del bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida («Polimorfo A» o «Polimorfo A del bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida»). Tal como se describe en la presente, la sal de tipo bromhidrato proporcionada en la presente, así como también el Polimorfo A, exhiben propiedades físicas que pueden ser explotadas con el fin de obtener nuevas propiedades farmacológicas y que se pueden utilizar en el desarrollo de productos farmacológicos y sustancias farmacológicas.

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

En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende el bromhidrato descrito anteriormente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El bromhidrato descrito anteriormente se puede preparar utilizando un método que comprende combinar *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.

5 El Polimorfo A de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida se puede definir de acuerdo con su patrón de difracción de rayos X en polvo. Por consiguiente, en una realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados y 22.0 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados y 22.0 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización más, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización más, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1. En otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Tabla 1.

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

25 El Polimorfo A se puede preparar utilizando un método que comprende combinar *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida con ácido bromhídrico.

30 En la presente se describe un método para recrystalizar el Polimorfo A, que comprende los pasos siguientes: (a) disolver el Polimorfo A en un primer disolvente y (b) añadir un segundo disolvente, de modo que dicho polimorfo se recrystalice. Por ejemplo, el primer disolvente es etanol y el segundo disolvente es MTBE. Por ejemplo, el método comprende (a) disolver el Polimorfo A en etanol, (b) calentar la mezcla, (c) añadir MTBE a la mezcla, formar un precipitado que comprende dicho polimorfo y filtrar el precipitado de modo que dicho polimorfo se recrystalice.

35 En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende el Polimorfo A y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 En la presente también se describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de tipo bromhidrato descrito en la presente, Polimorfo A o una composición farmacéutica que comprenda cualquiera de estos compuestos. Se pueden tratar varios tipos de cáncer, incluido el linfoma no hodgkiniano o el cáncer de mama.

45 En la presente se describe un método para inhibir la actividad de histona-metiltransferasa de EZH2 en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de tipo bromhidrato descrito en la presente, Polimorfo A o una composición farmacéutica que comprenda cualquiera de estos compuestos.

En la presente se describe un método para inhibir la actividad de histona-metiltransferasa de EZH2 *in vitro* que comprende administrar el compuesto de tipo bromhidrato descrito anteriormente o Polimorfo A.

50 En la presente se describe el uso del compuesto de tipo bromhidrato descrito anteriormente, Polimorfo A o una composición farmacéutica que comprenda cualquiera de estos compuestos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 La **Figura 1** representa el patrón de difracción de rayos X en polvo del Polimorfo A (monobromhidrato).
 La **Figura 2** representa el patrón de difracción de rayos X en polvo del dibromhidrato del Compuesto I.
 La **Figura 3** representa el termograma de calorimetría diferencial de barrido del Polimorfo A.
 La **Figura 4** representa la sorción dinámica de vapor del Polimorfo A, que demuestra la baja higroscopicidad de este compuesto.
 60 La **Figura 5** representa el análisis por HPLC del Polimorfo A durante tres días a una temperatura elevada. El Polimorfo A produjo unas impurezas mínimas durante este tiempo.
 La **Figura 6** representa la sorción dinámica de vapor de la sal sódica del Compuesto I, que demuestra la higroscopicidad significativa de este compuesto.
 La **Figura 7** representa la sorción dinámica de vapor de la sal de tipo hemisulfato del Compuesto I, que
 65 demuestra que este compuesto tiene una higroscopicidad moderadamente elevada.

Además de las ventajas anteriores, el bromhidrato del Compuesto I presenta una serie de propiedades físicas favorables en comparación con su forma de base libre, así como también otras sales de la base libre. En particular, el bromhidrato del Compuesto I presenta una higroscopicidad baja en comparación con otras formas salinas del Compuesto I. Para que un compuesto sea eficaz en terapia, se requiere por lo general que el compuesto sea mínimamente higroscópico. Las formas farmacológicas que son altamente higroscópicas pueden ser inestables, ya que la tasa de disolución de la forma farmacológica puede variar cuando se almacena en lugares de humedad variante. Además, la higroscopicidad puede afectar a la manipulación y producción a gran escala de un compuesto, ya que puede resultar difícil determinar el peso real de un agente activo higroscópico cuando se prepara una composición farmacéutica que comprende el agente. El bromhidrato del Compuesto I presenta una higroscopicidad baja en comparación con otras formas salinas del Compuesto I. En este sentido, se puede almacenar durante periodos apreciables sin que sufra cambios perjudiciales en su, por ejemplo, solubilidad, densidad o incluso composición química.

El bromhidrato del Compuesto I se puede producir en una forma altamente cristalina, lo cual resulta útil en la preparación de formulaciones farmacéuticas y mejorará el procesamiento, la manipulación y el almacenamiento general del compuesto farmacológico. En una realización preferida, la forma cristalina del bromhidrato del Compuesto I es una forma a la cual se hace referencia como «Polimorfo A».

La capacidad de una sustancia para existir en más de una forma cristalina se define como polimorfismo; las diferentes formas cristalinas de una sustancia particular se denominan «polimorfos». En general, el polimorfismo se ve afectado por la capacidad de una molécula de una sustancia para cambiar su conformación o para formar diferentes interacciones intermoleculares o intramoleculares, en particular puentes de hidrógeno, lo cual se refleja en diferentes disposiciones de los átomos en las redes cristalinas de diferentes polimorfos. Por el contrario, la forma externa global de una sustancia se conoce como «morfología», que se refiere a la forma externa del cristal y los planos presentes, sin hacer referencia a la estructura interna. Los cristales pueden presentar una morfología diferente en función de diferentes condiciones tales como, por ejemplo, la velocidad de crecimiento, agitación y presencia de impurezas.

Los diferentes polimorfos de una sustancia pueden poseer diferentes energías de la red cristalina y, por lo tanto, pueden mostrar en estado sólido diferentes propiedades físicas tales como forma, densidad, punto de fusión, color, estabilidad, solubilidad, tasa de disolución, etc., que pueden, a su vez, afectar a la estabilidad, tasa de disolución y/o biodisponibilidad de un polimorfo dado y su idoneidad para el uso como agente farmacéutico y en composiciones farmacéuticas.

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

El acceso a diferentes polimorfos del bromhidrato del Compuesto I es deseable por una serie de motivos. Uno de estos motivos es que los polimorfos individuales pueden incorporar diferentes impurezas, o residuos químicos, durante la cristalización. Por ejemplo, las impurezas se pueden eliminar durante el proceso de conversión del Compuesto I en el Polimorfo A.

Sin pretender vincularse a ninguna teoría, las formas polimórficas que exhiben formas cristalinas compactas presentan ventajas en cuanto a su facilidad de filtración y facilidad de fluidez. El Polimorfo A exhibe una forma cristalina compacta que, por consiguiente, presenta estas ventajas.

En ciertas realizaciones, el Polimorfo A se puede identificar basándose en picos característicos en un análisis de difracción de rayos X en polvo. La difracción de rayos X en polvo, a la cual también se hace referencia como DRXP, es una técnica científica que utiliza difracción de rayos X, neutrones o electrones en materiales en polvo, microcristalinos u otros materiales sólidos para caracterizar estructuralmente los materiales. En una realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados y 22.0 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados y 22.0 +/- 0.3 grados 2-theta.

En una realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 5 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 6 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización más, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 7 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 8 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados

- 2-theta. En otra realización más, el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 9 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización más, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 10 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- En otra realización más, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- En otra realización más, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta. En otra realización más, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1. En otra realización, el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con los valores 2-theta enumerados en la Tabla 1.
- El término «aproximadamente», tal como se utiliza en la presente, cuando se emplea haciendo referencia a un valor de grados 2-theta, se refiere al valor enumerado +/- 0.3 grados 2-theta.
- Las composiciones farmacéuticas que comprenden el Polimorfo A se pueden identificar comparando los patrones de difracción de rayos X en polvo de las composiciones con un patrón de difracción de rayos X en polvo del Polimorfo A. Se apreciará que las composiciones farmacéuticas que comprenden el Polimorfo A pueden exhibir patrones de difracción de rayos X en polvo que no sean idénticos en comparación con un patrón de difracción de rayos X en polvo del Polimorfo A puro.
- En ciertas realizaciones, el Polimorfo A se puede identificar basándose en un pico característico observado en un termograma de calorimetría diferencial de barrido. La calorimetría diferencial de barrido o CDB es una técnica termoanalítica en la que la diferencia en la cantidad de calor requerida para incrementar la temperatura de una muestra y una referencia se mide en función de la temperatura. En una realización, el Polimorfo A exhibe un termograma de calorimetría diferencial de barrido que tiene un pico característico expresado en unidades de °C a una temperatura de aproximadamente 255 +/- 5 °C. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un termograma de calorimetría diferencial de barrido que tiene un único pico endotérmico observado en el intervalo de temperatura de 250-255 °C. En otra realización, el Polimorfo A exhibe un termograma de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con la Figura 3.
- En ciertas realizaciones, el Polimorfo A puede contener impurezas. Los ejemplos no limitantes de impurezas incluyen formas polimórficas no deseadas o moléculas orgánicas e inorgánicas residuales tales como disolventes, agua o sales. En una realización, el Polimorfo A está exento de impurezas. En otra realización, el Polimorfo A contiene menos de un 10% en peso de impurezas totales. En otra realización, el Polimorfo A contiene menos de un 5% en peso de impurezas totales. En otra realización, el Polimorfo A contiene menos de un 1% en peso de impurezas totales. En otra realización más, el Polimorfo A contiene menos de un 0.1% en peso de impurezas totales.
- En ciertas realizaciones, el Polimorfo A es un sólido cristalino sustancialmente exento de bromhidrato del Compuesto I amorfo. La expresión «sustancialmente exento de bromhidrato del Compuesto I amorfo», tal como se utiliza en la presente, significa que el compuesto no contiene cantidades significativas de bromhidrato del Compuesto I amorfo. En ciertas realizaciones, hay al menos aproximadamente un 95% en peso de Polimorfo A cristalino presente. En otras realizaciones más de la invención, hay al menos aproximadamente un 99% en peso de Polimorfo A cristalino presente.
- En otra realización, el Polimorfo A está sustancialmente exento de Polimorfo B.
- La sal de la invención, y su forma cristalina Polimorfo A, se pueden encontrar juntas con otras sustancias o pueden estar aisladas. En algunas realizaciones, la sal de la invención, o su forma cristalina, está sustancialmente aislada. La expresión «sustancialmente aislada» significa que la sal o su forma cristalina está al menos parcialmente o sustancialmente separada del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en la sal de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 97% o al menos aproximadamente un 99% en peso del bromhidrato del Compuesto I y Polimorfo A. Los métodos para aislar los compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.
- Tanto el bromhidrato del Compuesto I como el Polimorfo A pueden adoptar la forma de cualquier tautómero razonable o una mezcla de tautómeros razonables. Un «tautómero», tal como se utiliza en la presente, se refiere a uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y que se convierten fácilmente de una forma isomérica a otra. Los ejemplos incluyen tautómeros ceto-enólicos tales como acetona/propen-2-ol y similares. El bromhidrato del Compuesto I

En la presente también se proporciona un método para preparar *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida que comprende hacer reaccionar ácido 5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico (5) con una sal de 3-(aminometil)-4,6-dimetildihidropiridin-2(1*H*)-ona. En una realización de este método, (5) es una forma cristalina.

El Compuesto I se puede hacer reaccionar con HBr acuoso en presencia de un disolvente adecuado para formar el Polimorfo A, una forma cristalina particular del bromhidrato. En una realización, el Compuesto I se hace reaccionar con HBr acuoso en presencia de etanol y acetato de etilo para formar el Polimorfo A.

Una vez que se ha preparado el polimorfo, este se puede recrystalizar, utilizando el mismo disolvente (o disolventes) que se utilizaron para preparar el polimorfo, o un disolvente (o disolventes) diferentes, para producir una composición con una mayor cristalinidad. En general, el Polimorfo A se puede recrystalizar disolviendo el polimorfo en uno o más disolventes, opcionalmente calentando y a continuación realizando un paso de enfriamiento opcional, y después aislando la estructura cristalina mediante, p. ej., un paso de filtración. Después de que el polimorfo se haya disuelto inicialmente en el primer disolvente (o combinación de disolventes), se puede añadir un disolvente diferente adicional en cualquier punto del proceso (antes o después del calentamiento, antes o después del enfriamiento, etc.) para producir la estructura cristalina deseada. Por ejemplo, se puede utilizar un primer disolvente para disolver el compuesto polimórfico y a continuación se puede añadir un segundo disolvente (p. ej., un antidisolvente) para provocar que el polimorfo precipite en la solución. En una realización, se añade agua al primer disolvente para facilitar la disolución del polimorfo.

Los ejemplos no limitantes de disolventes que se pueden utilizar para la recrystalización del Polimorfo A son los siguientes: metanol, etanol, acetato de etilo, éter *tert*-butil metílico, agua, alcohol isopropílico, tetrahydrofurano, acetona, acetonitrilo y 2-metiltetrahydrofurano, así como combinaciones de estos. Los ejemplos no limitantes de combinaciones de disolventes que son útiles para la recrystalización del Polimorfo A son (disolvente y antidisolvente, donde se puede añadir agua al primer disolvente para facilitar la disolución del polimorfo): metanol/agua y acetato de etilo, alcohol isopropílico/agua y acetato de etilo, tetrahydrofurano/agua y acetato de etilo, acetona y acetato de etilo, acetonitrilo/agua y acetato de etilo, etanol/agua y éter *tert*-butil metílico, alcohol isopropílico/agua y éter *tert*-butil metílico, etanol/agua y tetrahydrofurano, alcohol isopropílico/agua y acetona, y etanol/agua y acetato de etilo. En realizaciones particulares, las combinaciones de disolventes son metanol/agua y acetato de etilo, alcohol isopropílico/agua y acetato de etilo, etanol/agua y 2-metiltetrahydrofurano, y metanol/2-metiltetrahydrofurano.

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

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para recrystalizar el Polimorfo A, que comprende los pasos siguientes: (a) disolver el Polimorfo A en un primer disolvente y (b) añadir un segundo disolvente, de modo que dicho polimorfo se recrystalice. En una realización, el primer disolvente es etanol y el segundo disolvente es MTBE. En otra realización, el método comprende (a) disolver el Polimorfo A en etanol, (b) calentar la mezcla, (c) añadir MTBE a la mezcla, formar un precipitado que comprende dicho polimorfo y filtrar el precipitado de modo que dicho polimorfo se recrystalice.

Composiciones farmacéuticas

En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende el bromhidrato del Compuesto I y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En la presente también se describe una composición farmacéutica que comprende el Polimorfo A y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La expresión «composición farmacéutica» incluye preparados adecuados para la administración a mamíferos, p. ej., seres humanos. Cuando los compuestos descritos en la presente se administran como agentes farmacéuticos a mamíferos, p. ej., seres humanos, estos se pueden suministrar de por sí o como una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, de un 0.1% a un 99.9% (más preferentemente, de un 0.5 a un 90%) de principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos descritos en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I y el Polimorfo A) se pueden combinar con un portador farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas de combinación farmacéuticas convencionales. Un «portador farmacéuticamente aceptable», tal como se utiliza en la presente, puede incluir todos y cada uno de los disolventes, diluyentes u otro vehículo líquido, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes emulsionantes o espesantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma farmacéutica particular deseada. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) describe varios portadores utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en el caso de que cualquier medio portador convencional sea incompatible con los compuestos, por ejemplo, que produzca cualquier efecto biológico no deseado o que interaccione de otro modo de forma perjudicial con cual(es)quier otro(s) componente(s) de la composición farmacéutica, su uso se contempla dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin carácter limitante, azúcares tales como lactosa,

5 glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua exenta de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles atóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y agentes de perfume, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

15 Además, el portador puede adoptar una gran variedad de formas dependiendo de la forma del preparado deseada para la administración, p. ej., oral, nasal, rectal, vaginal, parenteral (incluidas las inyecciones o infusiones intravenosas). A la hora de preparar las composiciones para una forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Los medios farmacéuticos habituales incluyen, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares, en el caso de preparados líquidos orales (tales como, por ejemplo, suspensiones, soluciones, emulsiones y elixires); aerosoles; o portadores tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares, en el caso de preparados sólidos orales (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos).

20 En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y de perfume, conservantes y antioxidantes.

25 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes liposolubles tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, tocoferoles y similares; y agentes quelantes de metales tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

30 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos se pueden formular para que tengan cualquier concentración deseada. En algunas realizaciones, la composición se formula de modo que comprenda al menos una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la composición se formula de modo que comprenda una cantidad que no provocaría uno o más efectos secundarios no deseados.

35 Debido a que la forma cristalina del bromhidrato del Compuesto I se mantiene más fácilmente durante su preparación, las formas farmacéuticas sólidas son una forma preferida para la composición farmacéutica de la invención. Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral, tales como cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos, son particularmente preferidas. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

40 Las composiciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para la administración oral, sublingual, nasal, rectal, vaginal, tópica, bucal y parenteral (incluida la subcutánea, intramuscular e intravenosa), aunque la vía más adecuada dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica de la farmacia. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración oral en forma de una pastilla, cápsula, gragea o comprimido. En otras realizaciones, la composición farmacéutica adopta la forma de una suspensión.

45 Los compuestos descritos en la presente son adecuados como agente activo en composiciones farmacéuticas que son eficaces particularmente para tratar trastornos asociados con EZH2, especialmente el cáncer. La composición farmacéutica en varias realizaciones tiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del bromhidrato del Compuesto I o Polimorfo A, junto con otros excipientes, portadores, rellenos, diluyentes y similares farmacéuticamente aceptables.

50 Una «cantidad eficaz» terapéutica o farmacéuticamente es una cantidad de un compuesto (el bromhidrato del Compuesto I o Polimorfo A) que, cuando se administra a un paciente, mejora un síntoma de una enfermedad o afección, p. ej., previene los diferentes síntomas morfológicos y somáticos del cáncer. En un ejemplo, una cantidad eficaz del bromhidrato del Compuesto I o Polimorfo A es una cantidad suficiente para tratar el cáncer en un sujeto. La cantidad puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño y el peso del sujeto, el tipo de enfermedad y el compuesto particular de la invención. La cantidad de bromhidrato del Compuesto I o Polimorfo A que constituye una «cantidad eficaz» variará dependiendo del compuesto, el estado patológico y su gravedad, la edad del paciente que se ha de tratar y similares. La cantidad eficaz puede ser determinada de forma rutinaria por un experto en la técnica teniendo en cuenta sus conocimientos y esta divulgación.

65 El régimen de administración puede afectar a lo que constituye una cantidad farmacéuticamente eficaz. El bromhidrato del Compuesto I o Polimorfo A, y composiciones que comprenden cualquiera de estos compuestos, se pueden administrar

al sujeto ya sea antes o después del inicio de una enfermedad. Además, se pueden administrar varias dosis divididas, así como dosis escalonadas de forma diaria o secuencial, o la dosis se puede infundir de forma continuada o puede ser una inyección en bolo. Además, las dosis se pueden incrementar o reducir de forma proporcional según indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

5

Métodos de tratamiento

El bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A, inhiben la actividad de histona-metiltransferasa de EZH2 o uno de sus mutantes y, por consiguiente, en un aspecto de la invención, estos compuestos descritos en la presente son candidatos para tratar o prevenir ciertas afecciones y enfermedades. La presente invención proporciona estos compuestos para tratar afecciones y enfermedades cuya evolución se puede ver influida por la modulación del estado de metilación de histonas u otras proteínas, donde dicho estado de metilación está mediado al menos en parte por la actividad de EZH2. La modulación del estado de metilación de las histonas puede influir a su vez en el nivel de expresión de genes diana activados mediante metilación, y/o genes diana suprimidos mediante metilación. El uso puede incluir administrar a un sujeto que necesite un tratamiento de este tipo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente.

El trastorno en el que la metilación de proteínas mediada por EZH2 desempeña una función puede ser cáncer o una afección precancerosa. La presente invención proporciona además el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A, para su uso en el tratamiento de un cáncer o estado precanceroso cuya evolución se puede ver influida por la modulación de la metilación de proteínas mediada por EZH2, o para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de tal cáncer o estado precanceroso. Los tipos de cáncer ilustrativos que se pueden tratar incluyen linfomas, incluidos el linfoma no hodgkiniano, linfoma folicular (FL) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL); melanoma; y leucemia, incluida la CML. Una afección precancerosa ilustrativa incluye el síndrome mielodisplásico (MDS, conocido previamente como preleucemia).

En otra realización más, en la presente se proporcionan aquellos compuestos para su uso en el tratamiento de un linfoma que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz del bromhidrato del Compuesto I.

En otra realización más, en la presente se proporciona el Polimorfo A para tratar un linfoma.

También se describen métodos de protección contra un trastorno en el que la metilación de proteínas mediada por EZH2 desempeña una función en un sujeto que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) a un sujeto que necesite tal tratamiento. El trastorno puede ser cáncer, p. ej., cáncer en el que la metilación de proteínas mediada por EZH2 desempeña una función. También se describe el uso de un compuesto (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) para la preparación de un medicamento útil para la prevención de un trastorno proliferativo celular asociado, al menos en parte, con la metilación de proteínas mediada por EZH2.

Los compuestos descritos en la presente se pueden utilizar para modular la metilación de proteínas (p. ej., histonas), p. ej., para modular la actividad enzimática de histona-metiltransferasa o histona-desmetilasa. Al menos algunos de los compuestos se pueden utilizar *in vivo* o *in vitro* para modular la metilación de proteínas. Se ha descrito que la metilación de histonas está implicada en la expresión anómala de ciertos genes en cánceres y en el silenciamiento de genes neuronales en células no neuronales. Al menos algunos compuestos descritos en la presente son candidatos adecuados para tratar estas enfermedades, es decir, reducen la metilación o reestablecen la metilación a aproximadamente su nivel en células normales homólogas.

Se pueden utilizar compuestos que son moduladores de la metilación para modular la proliferación celular. Por ejemplo, en algunos casos se puede reducir la proliferación excesiva con agentes que disminuyen la metilación, mientras que se puede estimular la proliferación insuficiente con agentes que aumentan la metilación. Por consiguiente, las enfermedades que se pueden tratar con los compuestos de la invención pueden incluir enfermedades hiperproliferativas tales como el crecimiento celular benigno y crecimiento celular maligno.

Un «sujeto que lo necesite», tal como se utiliza en la presente, es un sujeto que padece un trastorno en el cual la metilación de proteínas mediada por EZH2 desempeña una función, o un sujeto que tiene un riesgo mayor de desarrollar tal trastorno respecto a la población en general. Un sujeto que lo necesite puede padecer una afección precancerosa. Preferentemente, un sujeto que lo necesite tiene cáncer. Un «sujeto» incluye un mamífero. El mamífero puede ser, p. ej., un ser humano o mamífero no humano apropiado tal como un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cabra, camello, oveja o un cerdo. El sujeto puede ser también un pájaro o ave de corral. En una realización, el mamífero es un ser humano.

La expresión «trastorno proliferativo celular», tal como se utiliza en la presente, se refiere a afecciones en las que un crecimiento no regulado o anómalo, o ambos, de células puede conducir al desarrollo de una enfermedad o afección no deseada, que puede que sea o no sea cancerosa. Los trastornos proliferativos celulares ilustrativos que se pueden tratar con los compuestos descritos en la presente engloban varias afecciones en las que la división celular está desregulada. Los trastornos proliferativos celulares ilustrativos incluyen, sin carácter limitante, neoplasias, tumores benignos, tumores malignos, afecciones precancerosas, tumores *in situ*, tumores encapsulados, tumores metastásicos, tumores líquidos,

- tumores sólidos, tumores inmunológicos, tumores hematológicos, cánceres, carcinomas, leucemias, linfomas, sarcomas y células que se dividen rápidamente. La expresión «célula que se divide rápidamente», tal como se utiliza en la presente, se define como cualquier célula que se divide a una velocidad que supera o es mayor de lo esperado u observado entre células vecinas o yuxtapuestas en el mismo tejido. Un trastorno proliferativo celular incluye un estado precanceroso o una
- 5
afección precancerosa. Un trastorno proliferativo celular incluye cáncer. Los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar o aliviar un síntoma del cáncer o para identificar candidatos adecuados para tales fines. El término «cáncer» incluye tumores sólidos, así como también tumores hematológicos y/o neoplasias malignas. Una «célula de un estado precanceroso» o «célula precancerosa» es una célula que manifiesta un trastorno proliferativo celular que es un
- 10
estado precanceroso o una afección precancerosa. Una «célula de un cáncer» o «célula cancerosa» es una célula que manifiesta un trastorno proliferativo celular que es un cáncer. Se puede utilizar cualquier medio reproducible de medición para identificar células cancerosas o células precancerosas. Se pueden identificar células cancerosas o células precancerosas mediante tipado histológico o graduación de una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de biopsia). Se pueden identificar células cancerosas o células precancerosas haciendo uso de marcadores moleculares apropiados.
- 15
Las afecciones o trastornos no cancerosos ilustrativos que se pueden tratar utilizando uno o más compuestos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, artritis reumatoide; inflamación; enfermedad autoinmunitaria; afecciones linfoproliferativas; acromegalia; espondilitis reumatoide; osteoartritis; gota, otras afecciones artríticas; sepsis; choque séptico; choque endotóxico; sepsis por gramnegativas; síndrome del choque tóxico; asma; síndrome de dificultad respiratoria en el adulto; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; inflamación pulmonar crónica; enfermedad intestinal inflamatoria; enfermedad de Crohn; psoriasis; eczema; colitis ulcerosa; fibrosis pancreática; fibrosis hepática; enfermedad renal aguda y crónica; síndrome del intestino irritable; piresis; reestenosis; malaria cerebral; accidente cerebrovascular y lesión isquémica; traumatismo neuronal; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; dolor agudo y crónico; rinitis alérgica; conjuntivitis alérgica; insuficiencia cardíaca crónica; síndrome coronario agudo; caquexia; malaria; lepra; leishmaniasis; enfermedad de Lyme; síndrome de Reiter; sinovitis aguda; degeneración muscular;
- 20
bursitis; tendinitis; tenosinovitis; síndrome del disco intervertebral prolapsado, roto o herniado; osteopetrosis; trombosis; reestenosis; silicosis; sarcosis pulmonar; enfermedades de resorción ósea, tales como osteoporosis; reacción del injerto frente al hospedador; esclerosis múltiple; lupus; fibromialgia; SIDA y otras enfermedades víricas tales como Herpes Zoster, Herpes Simple I o II, virus influenza y citomegalovirus; y diabetes mellitus.
- 25
Los diferentes tipos de cáncer ilustrativos que se pueden tratar utilizando uno o más compuestos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, carcinoma adrenocortical, tipos de cáncer relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer del apéndice, astrocitoma cerebelar de la infancia, astrocitoma cerebral de la infancia, carcinoma de células basales, cáncer de la piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de vejiga, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de huesos y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer cerebral, tumor cerebral, glioma del tronco cerebral, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de la ruta visual, cáncer de mama, carcinoides/adenomas bronquiales, tumor carcinoide, gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer cervicouterino, distintos tipos
- 30
de cáncer de la infancia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma de linfocitos T cutáneo, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer de endometrio, cáncer esofágico, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer de las vías biliares extrahepático, cáncer de ojos, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), tumor de células germinales, tumor de células germinales del ovario, glioma tumoral trofoblástico gestacional, cáncer de las vías digestivas y respiratorias altas, cáncer hepatocelular (hepático), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de células de las isletas (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer laríngeo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, tricoleucemia, cáncer de los labios y la cavidad oral, cáncer hepático, cáncer pulmonar, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma no hodgkiniano, linfoma del sistema nervioso central primario, macroglobulinemia de Waldenström, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (del ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer de cuello de células escamosas metastásico, cáncer de boca, cáncer de la lengua, síndrome neoplásico endocrino múltiple, micosis fungoides, síndromes mielodisplásicos, enfermedades
- 35
mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer ovárico, cáncer epitelial ovárico, tumor ovárico de bajo potencial maligno, cáncer pancreático, cáncer pancreático de células de las isletas, cáncer de la cavidad nasal y senos paranasales, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células transicionales, de uréter y pelvis renal, retinoblastoma, rhabdomiosarcoma, cáncer de las células salivares, tumores de la familia del sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de la piel de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago
- 40
(gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter y otros órganos urinarios,
- 45
50
55
60
65

tumor trofoblástico gestacional, cáncer de uretra, cáncer uterino de endometrio, sarcoma uterino, cáncer del cuerpo del útero, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva y tumor de Wilm.

5 Un «trastorno proliferativo celular del sistema hematológico» es un trastorno proliferativo celular que implica a células del sistema hematológico. Un trastorno proliferativo celular del sistema hematológico puede incluir linfoma, leucemia, neoplasias mieloides, neoplasias de mastocitos, mielodisplasia, gammopatía monoclonal benigna, granulomatosis linfomatoide, papulosis linfomatoide, policitemia vera, leucemia mielocítica crónica, metaplasia mielóide agnogénica y trombocitemia esencial. Un trastorno proliferativo celular del sistema hematológico puede incluir hiperplasia, displasia y metaplasia de las células del sistema hematológico. En un aspecto, las composiciones descritas en la presente se pueden utilizar para tratar un cáncer seleccionado del grupo constituido por un cáncer hematológico o un trastorno proliferativo celular hematológico, o se pueden utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. Un cáncer hematológico puede incluir mieloma múltiple, linfoma (incluido el linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfomas infantiles y linfomas de origen cutáneo y linfocítico), leucemia (incluida la leucemia infantil, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de mastocitos), neoplasias mieloides y neoplasias de mastocitos.

20 Un «trastorno proliferativo celular del pulmón» es un trastorno proliferativo celular que implica a células del pulmón. Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células del pulmón. Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir cáncer de pulmón, un estado precanceroso o afección precancerosa del pulmón, crecimientos o lesiones benignos del pulmón, y crecimientos o lesiones malignos del pulmón, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo que no sean el pulmón. En un aspecto, las composiciones descritas en la presente se pueden utilizar para tratar un cáncer de pulmón o trastornos proliferativos celulares del pulmón, o se pueden utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. El cáncer de pulmón puede incluir todas las formas de cáncer del pulmón. El cáncer de pulmón puede incluir neoplasias pulmonares malignas, carcinoma *in situ*, tumores carcinoides típicos y tumores carcinoides atípicos. El cáncer de pulmón puede incluir cáncer de pulmón microcítico («SCLC», por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón no microcítico («NSCLC», por sus siglas en inglés), carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma microcítico, carcinoma macrocítico, carcinoma de células adenoescamosas y mesotelioma. El cáncer del pulmón puede incluir «carcinoma cicatricial», carcinoma broncoalveolar, carcinoma de células gigantes, carcinoma de células con forma de husillo y carcinoma neuroendocrino macrocítico. El cáncer de pulmón puede incluir neoplasias pulmonares que tienen heterogeneidad histológica y ultraestructural (por ejemplo, tipos celulares mixtos).

35 Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células del pulmón. Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir cáncer de pulmón y afecciones precancerosas del pulmón. Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia del pulmón. Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir hiperplasia inducida por amianto, metaplasia escamosa y metaplasia mesotelial reactiva benigna. Los trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir el reemplazo del epitelio columnar con epitelio escamoso estratificado y displasia de la mucosa. Los individuos expuestos a la inhalación de agentes medioambientales dañinos tales como humo de cigarrillos y amianto pueden correr un mayor riesgo de desarrollar trastornos proliferativos celulares del pulmón. Las enfermedades pulmonares previas que pueden predisponer a los individuos al desarrollo de trastornos proliferativos celulares del pulmón pueden incluir la enfermedad pulmonar intersticial crónica, enfermedad pulmonar necrotizante, escleroderma, enfermedad reumatoide, sarcoidosis, pneumonitis intersticial, tuberculosis, neumonías repetidas, fibrosis pulmonar idiopática, granulomata, amiantosis, alveolitis fibrosante y enfermedad de Hodgkin.

45 Un «trastorno proliferativo celular del colon» es un trastorno proliferativo celular que implica a células del colon. Preferentemente, el trastorno proliferativo celular del colon es cáncer de colon. En un aspecto, las composiciones descritas en la presente se pueden utilizar para tratar un cáncer de colon o trastornos proliferativos celulares del colon, o se pueden utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. El cáncer de colon puede incluir todas las formas de cáncer de colon. El cáncer de colon puede incluir distintos tipos de cáncer de colon esporádico y hereditario. El cáncer de colon puede incluir neoplasias de colon malignas, carcinoma *in situ*, tumores carcinoides típicos y tumores carcinoides atípicos. El cáncer de colon puede incluir adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células adenoescamosas. El cáncer de colon puede estar asociado con un síndrome hereditario seleccionado del grupo constituido por cáncer colorrectal no polipósico hereditario, poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Gardner, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Turcot y poliposis juvenil. El cáncer de colon puede estar provocado por un síndrome hereditario seleccionado del grupo constituido por cáncer colorrectal no polipósico hereditario, poliposis adenomatosa familiar, síndrome de Gardner, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Turcot y poliposis juvenil.

60 Los trastornos proliferativos celulares del colon pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células del colon. Los trastornos proliferativos celulares del colon pueden incluir cáncer de colon, afecciones precancerosas del colon, pólipos adenomatosos del colon y lesiones metacrónicas del colon. Un trastorno proliferativo celular del colon puede incluir adenoma. Los trastornos proliferativos celulares del colon pueden estar caracterizados por hiperplasia, metaplasia y displasia del colon. Las enfermedades del colon previas que puede que predispongan a los individuos al desarrollo de trastornos proliferativos celulares del colon pueden incluir cáncer de colon previo. Las enfermedades actuales que pueden predisponer a los individuos al desarrollo de trastornos proliferativos celulares del colon pueden incluir la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Un trastorno proliferativo celular del colon puede estar

asociado con una mutación en un gen seleccionado del grupo constituido por p53, *ras*, *FAP* y *DCC*. Un individuo puede correr un riesgo elevado de desarrollar un trastorno proliferativo celular del colon debido a la presencia de una mutación en un gen seleccionado del grupo constituido por p53, *ras*, *FAP* y *DCC*.

5 Un «trastorno proliferativo celular del páncreas» es un trastorno proliferativo celular que implica a células del páncreas. Los trastornos proliferativos celulares del páncreas pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células pancreáticas. Los trastornos proliferativos celulares del páncreas pueden incluir cáncer de páncreas, un estado precanceroso o afección precancerosa del páncreas, hiperplasia del páncreas y displasia del páncreas, crecimientos o lesiones benignos del páncreas y crecimientos o lesiones malignos del páncreas, y lesiones metastásicas
10 en tejido y órganos del cuerpo que no sean el páncreas. El cáncer pancreático puede incluir todas las formas de cáncer de páncreas. El cáncer pancreático puede incluir adenocarcinoma ductal, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células gigantes pleomórficas, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células gigantes de tipo osteoclasto, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma acinoso, carcinoma macrocítico no clasificado, carcinoma microcítico, pancreoblastoma, neoplasia papilar, cistadenoma mucinoso, neoplasia quística papilar y cistadenoma seroso. El cáncer
15 pancreático también puede incluir neoplasias pancreáticas que tienen heterogeneidad histológica y ultraestructural (por ejemplo, tipos celulares mixtos).

Un «trastorno proliferativo celular de la próstata» es un trastorno proliferativo celular que implica a células de la próstata. Los trastornos proliferativos celulares de la próstata pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células de la próstata. Los trastornos proliferativos celulares de la próstata pueden incluir cáncer de próstata, un estado precanceroso o afección precancerosa de la próstata, crecimientos o lesiones benignos de la próstata y crecimientos o lesiones malignos de la próstata, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo que no sean la
20 próstata. Los trastornos proliferativos celulares de la próstata pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de la próstata.

Un «trastorno proliferativo celular de la piel» es un trastorno proliferativo celular que implica a células de la piel. Los trastornos proliferativos celulares de la piel pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células de la piel. Los trastornos proliferativos celulares de la piel pueden incluir un estado precanceroso o afección precancerosa de la piel, crecimientos o lesiones benignos de la piel, melanoma, melanoma maligno y otros
25 crecimientos o lesiones malignos de la piel, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo que no sean la piel. Los trastornos proliferativos celulares de la piel pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de la piel.

Un «trastorno proliferativo celular del ovario» es un trastorno proliferativo celular que implica a células del ovario. Los trastornos proliferativos celulares del ovario pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células del ovario. Los trastornos proliferativos celulares del ovario pueden incluir un estado precanceroso o afección precancerosa del ovario, crecimientos o lesiones benignos del ovario, cáncer de ovario, crecimientos o lesiones malignos del ovario, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo que no sean el ovario. Los trastornos
35 proliferativos celulares de la piel pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia del ovario.

Un «trastorno proliferativo celular de mama» es un trastorno proliferativo celular que implica a células de la mama. Los trastornos proliferativos celulares de la mama pueden incluir todas las formas de trastornos proliferativos celulares que afectan a células de la mama. Los trastornos proliferativos celulares de la mama pueden incluir cáncer de mama, un estado precanceroso o afección precancerosa de la mama, crecimientos o lesiones benignos de la mama y crecimientos o lesiones malignos de la mama, y lesiones metastásicas en tejido y órganos del cuerpo que no sean la mama. Los
40 trastornos proliferativos celulares de la mama pueden incluir hiperplasia, metaplasia y displasia de la mama.

Un trastorno proliferativo celular de la mama puede ser una afección precancerosa de la mama. Las composiciones descritas en la presente se pueden utilizar para tratar una afección precancerosa de la mama. Una afección precancerosa de la mama puede incluir hiperplasia atípica de la mama, carcinoma ductal *in situ* (DCIS, por sus siglas en inglés), carcinoma intraductal, carcinoma lobular *in situ* (LCIS, por sus siglas en inglés), neoplasia lobular y crecimiento o lesión de estadio 0 o grado 0 de la mama (por ejemplo, carcinoma *in situ* o cáncer de mama de estadio 0 o grado 0). Una afección precancerosa de la mama se puede estadiar de acuerdo con el esquema de clasificación TNM tal como lo acepta el Comité Conjunto Estadounidense del Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés), donde al tumor primario (T) se le ha asignado un estadio T0 o Tis; y donde a los ganglios linfáticos regionales (N) se les ha asignado un estadio N0; y donde a la metástasis distante (M) se le ha asignado un estadio M0.
50
55

El trastorno proliferativo celular de la mama puede ser cáncer de mama. En un aspecto, las composiciones descritas en la presente se pueden utilizar para tratar el cáncer de mama o se pueden utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. El cáncer de mama puede incluir todas las formas de cáncer de mama. El cáncer de mama puede incluir distintos tipos de cáncer de mama epitelial primario. El cáncer de mama puede incluir distintos tipos de cáncer en los que la mama se ve afectada por otros tumores tales como linfoma, sarcoma o melanoma. El cáncer de mama puede incluir carcinoma de la mama, carcinoma ductal de la mama, carcinoma lobular de la mama, carcinoma indiferenciado de la mama, cistosarcoma filoides de la mama, angiosarcoma de la mama y linfoma primario de la mama. El cáncer de mama puede incluir cáncer de mama de estadio I, II, IIIA, IIIB, IIIC y IV. El carcinoma ductal de la mama puede incluir carcinoma invasivo, carcinoma invasivo *in situ* con componente intraductal predominante, cáncer de mama inflamatorio y un carcinoma ductal de la mama con un tipo histológico seleccionado del grupo constituido por comedo, mucinoso (coloide),
60
65

medular, medular con infiltración linfocítica, papilar, escirroso y tubular. El carcinoma lobular de la mama puede incluir carcinoma lobular invasivo con componente *in situ* predominante, carcinoma lobular invasivo y carcinoma lobular infiltrante. El cáncer de mama puede incluir la enfermedad de Paget, la enfermedad de Paget con carcinoma intraductal y la enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasivo. El cáncer de mama puede incluir neoplasias de mama que tienen heterogeneidad histológica y ultraestructural (por ejemplo, tipos celulares mixtos).

Los compuestos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar el cáncer de mama o se pueden utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir cáncer de mama familiar. Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir cáncer de mama esporádico. Un cáncer de mama que se va a tratar puede aparecer en un sujeto masculino. Un cáncer de mama que se va a tratar puede aparecer en un sujeto femenino. Un cáncer de mama que se va a tratar puede aparecer en un sujeto femenino premenopáusico o un sujeto femenino posmenopáusico. Un cáncer de mama que se va a tratar puede aparecer en un sujeto con una edad igual o superior a 30 años, o un sujeto con una edad inferior a 30 años. Un cáncer de mama que se va a tratar ha aparecido en un sujeto con una edad igual o superior a 50 años, o un sujeto con una edad inferior a 50 años. Un cáncer de mama que se va a tratar puede aparecer en un sujeto con una edad igual o superior a 70 años, o un sujeto con una edad inferior a 70 años.

Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar para identificar una mutación espontánea o familiar en BRCA1, BRCA2 o p53. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar por tener la amplificación del gen HER2/neu, sobreexpresión de HER2/neu, o un nivel de expresión bajo, intermedio o elevado de HER2/neu. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar para un marcador seleccionado del grupo constituido por el receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés), receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés), receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano, Ki-67, CA15-3, CA 27-29 y c-Met. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar como desconocido para ER, rico en ER o pobre en ER. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar como negativo para ER o positivo para ER. El tipificado de ER de un cáncer de mama se puede realizar mediante cualquier medio reproducible. El tipificado de ER de un cáncer de mama se puede realizar tal como se expone en *Onkologie* 27: 175-179 (2004). Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar como desconocido para PR, rico en PR o pobre en PR. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar como negativo para PR o positivo para PR. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar como positivo para un receptor o negativo para un receptor. Se puede tipificar un cáncer de mama que se va a tratar por estar asociado con niveles sanguíneos elevados de CA 15-3 o CA 27-29, o ambos.

Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir un tumor de mama localizado. Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir un tumor de mama que está asociado con una biopsia negativa de un ganglio linfático centinela (SLN, por sus siglas en inglés). Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir un tumor de mama que está asociado con una biopsia positiva de un ganglio linfático centinela (SLN). Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir un tumor de mama que está asociado con uno o más ganglios linfáticos axilares positivos, donde los ganglios linfáticos axilares se han estadificado mediante cualquier método aplicable. Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir un tumor de mama que se ha tipificado por tener un estado negativo del ganglio (por ejemplo, negativo para el ganglio) o estado positivo del ganglio (por ejemplo, positivo para el ganglio). Un cáncer de mama que se va a tratar puede incluir un tumor de mama con metástasis en otras ubicaciones del cuerpo. Un cáncer de mama que se va a tratar se puede clasificar por tener metástasis en una ubicación seleccionada del grupo constituido por hueso, pulmón, hígado o cerebro. Un cáncer de mama que se va a tratar se puede clasificar de acuerdo con una característica seleccionada del grupo constituido por metastásico, localizado, regional, regional-local, avanzado localmente, distante, multicéntrico, bilateral, ipsilateral, contralateral, recién diagnosticado, recurrente e inoperable.

Un compuesto descrito en la presente se puede utilizar para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular de la mama, o para tratar o prevenir cáncer de mama, en un sujeto que corre un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto a la población en general, o se puede utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto a la población en general es un sujeto femenino con antecedentes familiares o antecedentes personales de cáncer de mama. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto a la población en general es un sujeto femenino que tiene una mutación espontánea o de la línea germinal en BRCA1 o BRCA2, o ambos. Un sujeto con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto a la población en general es un sujeto femenino con antecedentes familiares de cáncer de mama y una mutación espontánea o de la línea germinal en BRCA1 o BRCA2, o ambos. Un sujeto con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto a la población en general es una mujer con una edad superior a los 30 años, edad superior a los 40 años, edad superior a los 50 años, edad superior a los 60 años, edad superior a los 70 años, edad superior a los 80 años o edad superior a los 90 años. Un sujeto con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama respecto a la población en general es un sujeto con hiperplasia atípica de la mama, carcinoma ductal *in situ* (DCIS), carcinoma intraductal, carcinoma lobular *in situ* (LCIS), neoplasia lobular, o una lesión o crecimiento de estadio 0 de la mama (por ejemplo, carcinoma *in situ* o cáncer de mama de estadio 0 o grado 0).

Un cáncer de mama que se va a tratar se puede clasificar histológicamente de acuerdo con el sistema Scarff-Bloom-Richardson, donde a un tumor de mama se le ha asignado una puntuación de recuento de la mitosis de 1, 2 o 3; una puntuación de pleiomorfismo nuclear de 1, 2 o 3; una puntuación de formación de túbulos de 1, 2 o 3; y una puntuación de Scarff-Bloom-Richardson total entre 3 y 9. A un cáncer de mama que se va a tratar se le puede asignar un grado

tumoral de acuerdo con el Panel de Consenso Internacional sobre el Tratamiento del Cáncer de mama seleccionado del grupo constituido por grado 1, grado 1-2, grado 2, grado 2-3 o grado 3.

5 En la presente se describe un método para tratar el cáncer de mama que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz del bromhidrato del Compuesto I.

En la presente también se describe un método para tratar el cáncer de mama que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz del Polimorfo A.

10 Un cáncer que se va a tratar se puede estadificar de acuerdo con el sistema de clasificación TNM del Comité Conjunto Estadounidense del Cáncer (AJCC), donde al tumor (T) se le ha asignado un estadio TX, T1, T1mic, T1a, T1b, T1c, T2, T3, T4, T4a, T4b, T4c o T4d; y donde a los ganglios linfáticos regionales (N) se les ha asignado un estadio NX, N0, N1, N2, N2a, N2b, N3, N3a, N3b o N3c; y donde a la metástasis distante (M) se le puede asignar un estadio MX, M0 o M1.
 15 Un cáncer que se va a tratar se puede estadificar de acuerdo con la clasificación del Comité Conjunto Estadounidense del Cáncer (AJCC) como estadio I, estadio IIA, estadio IIB, estadio IIIA, estadio IIIB, estadio IIIC o estadio IV. A un cáncer que se va a tratar se le puede asignar un grado de acuerdo con una clasificación de AJCC como grado GX (por ejemplo, no se puede evaluar el grado), grado 1, grado 2, grado 3 o grado 4. Un cáncer que se va a tratar se puede estadificar de acuerdo con una clasificación patológica de AJCC (pN) de pNX, pN0, PN0 (I-), PN0 (I+), PN0 (mol-), PN0 (mol+), PN1, PN1(mi), PN1a, PN1b, PN1c, pN2, pN2a, pN2b, pN3, pN3a, pN3b o pN3c.

20 Un cáncer que se va a tratar puede incluir un tumor del que se ha determinado que tiene un diámetro igual o inferior a aproximadamente 2 centímetros. Un cáncer que se va a tratar puede incluir un tumor del que se ha determinado que tiene un diámetro de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 centímetros. Un cáncer que se va a tratar puede incluir un tumor del que se ha determinado que tiene un diámetro igual o superior a aproximadamente 3 centímetros. Un cáncer que se va a tratar puede incluir un tumor del que se ha determinado que tiene un diámetro superior a 5 centímetros. Un
 25 cáncer que se va a tratar se puede clasificar mediante el aspecto microscópico como bien diferenciado, moderadamente diferenciado, poco diferenciado o no diferenciado. Un cáncer que se va a tratar se puede clasificar mediante el aspecto microscópico respecto al recuento mitótico (por ejemplo, la cantidad de división celular) o pleiomorfismo nuclear (por ejemplo, cambio en las células). Un cáncer que se va a tratar se puede clasificar mediante el aspecto microscópico según esté asociado con áreas de necrosis (por ejemplo, áreas de células degenerantes o moribundas). Un cáncer que se va a tratar se puede clasificar por tener un cariotipo anómalo, tener un número anómalo de cromosomas o tener uno o más cromosomas con aspecto anómalo. Un cáncer que se va a tratar se puede clasificar por ser aneuploide, triploide, tetraploide o por tener una ploidía alterada. Un cáncer que se va a tratar se puede clasificar por tener una traslocación cromosómica, o una delección o duplicación de un cromosoma completo, o una región de delección, duplicación o
 30 amplificación de una porción de un cromosoma.

Un cáncer que se va a tratar se puede evaluar mediante citometría de ADN, citometría de flujo o citometría por imagen. Un cáncer que se va a tratar se puede tipificar por tener un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de células en el estadio de síntesis de la división celular (por ejemplo, en la fase S de la división celular). Un cáncer que se va a
 40 tratar se puede tipificar por tener una fracción baja en la fase S o una fracción elevada en la fase S.

Una «célula normal», tal como se utiliza en la presente, es una célula que no se puede clasificar como parte de un «trastorno proliferativo celular». Una célula normal carece de crecimiento no regulado o anómalo, o ambos, que pueden conducir al desarrollo de una afección o una enfermedad no deseada. Preferentemente, una célula normal posee
 45 mecanismos de control en puntos de comprobación del ciclo celular que funcionan con normalidad.

La expresión «poner en contacto una célula», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una condición en la que un compuesto u otra composición de materia está en contacto directo con una célula, o está lo suficientemente cerca como para inducir un efecto biológico deseado en una célula.
 50

Un «compuesto candidato», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto descrito en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) que ha sido evaluado o se evaluará en uno o más ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo* para determinar si es probable que ese compuesto produzca una respuesta biológica o médica deseada en una célula, tejido, sistema, animal o ser humano que esté buscando un investigador o profesional sanitario.
 55 Un compuesto candidato es un compuesto descrito en la presente. La respuesta biológica o médica puede ser el tratamiento del cáncer. La respuesta biológica o médica puede ser el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo celular. La respuesta o efecto biológico también puede incluir un cambio en la proliferación o crecimiento celular que ocurre *in vitro* o en un modelo en animales, así como también otros cambios biológicos que se pueden observar *in vitro*. Los ensayos biológicos *in vitro* o *in vivo* pueden incluir, sin carácter limitante, ensayos de actividad enzimática, ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética, ensayos de genes indicadores, ensayos de viabilidad celular
 60 *in vitro* y los ensayos descritos en la presente.

Una «monoterapia», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la administración de un solo compuesto activo o terapéutico a un sujeto que lo necesite. Preferentemente, la monoterapia implicará la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo. Por ejemplo, una monoterapia para el cáncer con uno de los compuestos descritos en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) para un sujeto que necesite
 65

tratamiento del cáncer. La monoterapia se puede contrastar con la terapia combinada, en la que se administra una combinación de múltiples compuestos activos, preferentemente con cada componente de la combinación presente en una cantidad terapéuticamente eficaz. En un aspecto, la monoterapia con un compuesto descrito en la presente es más eficaz que la terapia combinada a la hora de inducir un efecto biológico deseado.

5

El término «tratamiento» o «tratar», tal como se utiliza en la presente, describe el manejo y cuidado de un paciente con el fin de combatir una enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de un compuesto descrito en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) para aliviar los síntomas o las complicaciones de una enfermedad, afección o trastorno, o para eliminar la enfermedad, afección o trastorno. El término «tratar» puede incluir también el tratamiento de una célula *in vitro* o un modelo en animales.

10

Un compuesto descrito en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) también se puede utilizar para prevenir una enfermedad, afección o trastorno, o se puede utilizar para identificar candidatos adecuados para tales fines. El término «prevención» o «prevenir», tal como se utiliza en la presente, describe la reducción o eliminación de la aparición de los síntomas o complicaciones de la enfermedad, afección o trastorno.

15

Se pretende que el término «aliviar», tal como se utiliza en la presente, describa un proceso mediante el cual se reduce la gravedad de un signo o síntoma de un trastorno. De manera importante, se puede aliviar un signo o síntoma sin eliminarlo. La administración de composiciones farmacéuticas descritas en la presente puede dar lugar a la eliminación de un signo o síntoma, sin embargo, no se requiere la eliminación. Cabe esperar que las dosificaciones eficaces reduzcan la gravedad de un signo o síntoma. Por ejemplo, se alivia un signo o síntoma de un trastorno, tal como un cáncer, que se puede producir en múltiples ubicaciones, si se hace disminuir la gravedad del cáncer en al menos una de las múltiples ubicaciones.

20

Se pretende que el término «gravedad», tal como se utiliza en la presente, describa el potencial del cáncer para transformarse desde un estado precanceroso, o benigno, hasta un estado maligno. Como alternativa, o además, se pretende que la gravedad describa el estadio de un cáncer, por ejemplo, de acuerdo con el sistema TNM (aceptado por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés) y el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC)) o mediante otros métodos reconocidos en la técnica. El estadio de un cáncer se refiere a la extensión o gravedad del cáncer, basándose en factores tales como la ubicación del tumor primario, tamaño tumoral, número de tumores y afectación de ganglios linfáticos (diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos). Como alternativa, o además, se pretende que la gravedad describa el grado del tumor por métodos reconocidos en la técnica (remítase al Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov). El grado del tumor es un sistema utilizado para clasificar células cancerosas en cuanto a cuán anómalas se ven en el microscopio y con qué rapidez es probable que el tumor crezca y se disemine. A la hora de determinar el grado del tumor, se toman en consideración muchos factores, incluidos la estructura y el patrón de crecimiento de las células. Los factores específicos utilizados para determinar el grado del tumor varían dependiendo de cada tipo de cáncer. La gravedad describe además un grado histológico, también denominado diferenciación, que se refiere a cuántas de las células tumorales se asemejan a células normales del mismo tipo de tejido (remítase al Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov). Además, la gravedad describe un grado nuclear, que se refiere al tamaño y la forma del núcleo en células tumorales y el porcentaje de células tumorales que están en división (remítase al Instituto Nacional del Cáncer, www.cancer.gov).

25

30

35

40

La gravedad describe el grado hasta el que un tumor ha secretado factores de crecimiento, ha degradado la matriz extracelular, se ha vascularizado, ha perdido adhesión a tejidos adyacentes o ha metastatizado. Además, la gravedad describe el número de ubicaciones en las que un tumor primario se ha metastatizado. Finalmente, la gravedad incluye la dificultad para tratar tumores de tipos y ubicaciones variables. Por ejemplo, se considera que los tumores inoperables, aquellos tipos de cáncer que tienen mayor acceso a múltiples sistemas corporales (tumores hematológicos e inmunológicos) y aquellos que son los más resistentes a los tratamientos tradicionales, son los más graves. En estas situaciones, se considera que el hecho de prolongar la esperanza de vida del sujeto y/o reducir el dolor, disminuir la proporción de células cancerosas o restringir las células a un sistema, y mejorar el estadio/grado del tumor/grado histológico/grado nuclear del cáncer alivian un signo o síntoma del cáncer.

45

50

El término «síntoma», tal como se utiliza en la presente, se define como una indicación de la enfermedad, dolencia, lesión o de que algo no está bien en el organismo. Los síntomas son sentidos o percibidos por el individuo que experimenta el síntoma, pero puede que no sean percibidos fácilmente por otros. Los otros se definen como personas que no son profesionales sanitarios.

55

El término «signo», tal como se utiliza en la presente, también se define como una indicación de que algo no está bien en el organismo. Pero los signos se definen como elementos que puede observar un médico, enfermero u otro profesional sanitario.

60

El cáncer es un grupo de enfermedades que puede provocar casi cualquier signo o síntoma. Las señales y síntomas dependerán de dónde esté el cáncer, el tamaño del cáncer, y de cuánto afecte a las estructuras u órganos vecinos. Si un cáncer se disemina (metastatiza), entonces pueden aparecer síntomas en diferentes partes del cuerpo.

65

A medida que un cáncer crece, empieza a empujar a los órganos, vasos sanguíneos y nervios próximos. Esta presión crea algunos de los signos y síntomas del cáncer. Si el cáncer se encuentra en un área crítica, tal como ciertas partes del cerebro, incluso el tumor más pequeño puede provocar los primeros síntomas.

5 Pero en algunas ocasiones varios tipos de cáncer empiezan en lugares en los que no provocan ningunos síntomas hasta que el cáncer se ha vuelto bastante grande. Los cánceres de páncreas, por ejemplo, normalmente no crecen lo suficiente para que sean detectados desde fuera del organismo. Algunos cánceres pancreáticos no provocan síntomas hasta que empiezan a crecer alrededor de nervios cercanos (esto provoca dolor de espalda). Otros crecen alrededor de las vías biliares, lo que bloquea el flujo de bilis y provoca un amarilleamiento de la piel que se conoce como ictericia. En el momento
10 en que un cáncer pancreático provoca estos signos o síntomas, normalmente ha alcanzado un estadio avanzado.

Un cáncer también puede causar síntomas tales como fiebre, fatiga o pérdida de peso. Esto puede ser debido a que las células cancerosas utilizan gran parte del suministro de energía del organismo o liberan sustancias que cambian el metabolismo del organismo. O el cáncer puede provocar que el sistema inmunitario reaccione de maneras que producen
15 estos síntomas.

En ocasiones, las células cancerosas liberan sustancias al torrente sanguíneo que provocan síntomas que normalmente no se cree que procedan de los cánceres. Por ejemplo, algunos tipos de cáncer de páncreas pueden liberar sustancias que provocan que se desarrollen coágulos sanguíneos en las venas de las piernas. Algunos tipos de cáncer de pulmón producen sustancias similares a hormonas que afectan a los niveles de calcio en sangre, lo que afecta a los nervios y músculos y provoca debilidad y mareos.
20

El cáncer presenta varios signos o síntomas generales que se producen cuando están presentes una variedad de subtipos de células cancerosas. La mayoría de personas con cáncer perderán peso en algún momento con su enfermedad. Una pérdida de peso inesperada (no intencionada) de 10 libras o más puede ser el primer signo de cáncer, particularmente los cánceres de páncreas, estómago, esófago o pulmón.
25

La fiebre es muy habitual con el cáncer, pero se observa más a menudo en la enfermedad avanzada. Casi todos los pacientes con cáncer tendrán fiebre en algún momento, especialmente si el cáncer o su tratamiento afecta al sistema inmunitario y hace que sea más difícil para el organismo luchar contra la infección. Menos a menudo, la fiebre puede ser un primer signo del cáncer, tal como con la leucemia o un linfoma.
30

La fatiga puede ser un síntoma importante a medida que el cáncer avanza. Sin embargo, puede aparecer pronto en cánceres tales como la leucemia o si el cáncer está provocando una pérdida continuada de sangre, como sucede en algunos cánceres de estómago o colon.
35

El dolor puede ser un primer síntoma en algunos cánceres tales como los cánceres óseos o el cáncer testicular. Pero en la mayoría de los casos el dolor es un síntoma de enfermedad avanzada.

40 Junto con los cánceres de la piel (remítase a la siguiente sección), algunos cánceres internos pueden provocar signos en la piel que pueden ser observados. Estos cambios incluyen un aspecto de la piel más oscuro (hiperpigmentación), amarillo (ictericia) o rojo (eritema); picor; o crecimiento excesivo de pelo.

Como alternativa, o además, los subtipos de cáncer presentan signos o síntomas específicos. Cambios en los hábitos intestinales o la función de la vejiga podrían indicar cáncer. Un cambio en el tamaño de las heces, diarrea o estreñimiento a largo plazo pueden ser un signo de cáncer de colon. El dolor al orinar, sangre en la orina o un cambio en la función de la vejiga (tal como micciones más frecuentes o menos frecuentes) se podrían relacionar con el cáncer de próstata o de vejiga.
45

50 Cambios en el aspecto o el estado de la piel de una afección de la piel nueva podrían indicar cáncer. Los cánceres de piel pueden sangrar o presentar el aspecto de llagas que no se curan. Una llaga duradera en la boca podría ser un cáncer oral, especialmente en pacientes que fuman, mastican tabaco o beben alcohol frecuentemente. Las llagas en el pene o la vagina pueden ser o bien signos de infección o de un cáncer en estadio inicial.

55 Un sangrado o flujo inusual podría indicar cáncer. Un sangrado inusual se puede producir en un cáncer o bien de estado inicial o avanzado. La sangre en el esputo (flema) puede ser un signo de cáncer de pulmón. La sangre en las heces (o heces oscuras o negras) podría ser un signo de cáncer rectal o de colon. El cáncer del cuello uterino o del endometrio (revestimiento del útero) puede provocar sangrado vaginal. La sangre en la orina puede ser un signo de cáncer de vejiga o riñón. Una secreción con sangre procedente del pezón puede ser un signo de cáncer de mama.
60

Un espesamiento o bulto en la mama u otras partes del organismo podría indicar la presencia de un cáncer. Muchos tipos de cáncer se pueden sentir a través de la piel, principalmente en la mama, testículo, nódulos (glándulas) linfáticos y los tejidos blandos del organismo. Un bulto o espesamiento puede ser un signo inicial o avanzado del cáncer. Cualquier bulto o espesamiento podría ser indicativo de cáncer, especialmente si su formación es nueva o ha crecido su tamaño.
65

La indigestión o problemas al tragar podrían indicar cáncer. Aunque estos síntomas tienen habitualmente otras causas, la indigestión o problemas al tragar pueden ser un signo de cáncer del esófago, estómago o faringe (garganta).

5 Los cambios recientes en una verruga o lunar podrían ser indicativos de cáncer. Cualquier verruga, lunar o peca que cambie de color, tamaño o forma, o que pierda sus límites definidos indica el desarrollo potencial de cáncer. Por ejemplo, la lesión de la piel puede ser un melanoma.

10 Una ronquera o tos persistente podría ser indicativa de cáncer. Una tos que no desaparece podría ser un signo de cáncer de pulmón. La ronquera puede ser un signo de cáncer de laringe (caja laríngea) o tiroides.

Aunque los signos y síntomas enumerados anteriormente son los más comunes observados con el cáncer, hay muchos otros que son menos comunes y no se enumeran en la presente. Sin embargo, todos los signos y síntomas del cáncer reconocidos en la técnica quedan contemplados y abarcados por la presente invención.

15 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una reducción del tamaño de un tumor. Una reducción del tamaño de un tumor también se puede denominar «regresión tumoral». Preferentemente, después del tratamiento, el tamaño del tumor se reduce en un 5% o más respecto a su tamaño antes del tratamiento; más preferentemente, el tamaño del tumor se reduce en un 10% o más; más preferentemente, se reduce en un 20% o más; más preferentemente, se reduce en un 30% o más; más preferentemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferentemente, se reduce en un 50% o más; y de la manera más preferida, se reduce en más de un 75% o más. El tamaño de un tumor puede medirse mediante cualquier medio de medición reproducible. El tamaño de un tumor puede medirse como un diámetro del tumor.

25 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una reducción del volumen del tumor. Preferentemente, después del tratamiento, el volumen del tumor se reduce en un 5% o más respecto a su tamaño antes del tratamiento; más preferentemente, el volumen del tumor se reduce en un 10% o más; más preferentemente, se reduce en un 20% o más; más preferentemente, se reduce en un 30% o más; más preferentemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferentemente, se reduce en un 50% o más; y de la manera más preferida, se reduce en más de un 75% o más. El volumen del tumor puede medirse mediante cualquier medio de medición reproducible.

30 El tratamiento del cáncer da como resultado una disminución del número de tumores. Preferentemente, después del tratamiento, el número de tumores se reduce en un 5% o más respecto a su número antes del tratamiento; más preferentemente, el número de tumores se reduce en un 10% o más; más preferentemente, se reduce en un 20% o más; más preferentemente, se reduce en un 30% o más; más preferentemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferentemente, se reduce en un 50% o más; y de la manera más preferida, se reduce en más de un 75%. El número de tumores puede medirse mediante cualquier medio de medición reproducible. El número de tumores puede medirse contando los tumores visibles a simple vista o con un aumento especificado. Preferentemente, el aumento especificado es 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o 50x.

40 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución del número de lesiones metastásicas en otros tejidos u órganos alejados del sitio del tumor primario. Preferentemente, después del tratamiento, el número de lesiones metastásicas se reduce en un 5% o más respecto a su número antes del tratamiento; más preferentemente, el número de lesiones metastásicas se reduce en un 10% o más; más preferentemente, se reduce en un 20% o más; más preferentemente, se reduce en un 30% o más; más preferentemente, se reduce en un 40% o más; aún más preferentemente, se reduce en un 50% o más; y de la manera más preferida, se reduce en más de un 75%. El número de lesiones metastásicas puede medirse mediante cualquier medio de medición reproducible. El número de lesiones metastásicas puede medirse contando las lesiones metastásicas visibles a simple vista o con un aumento especificado. Preferentemente, el aumento especificado es 2x, 3x, 4x, 5x, 10x o 50x.

50 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe solo portador. Preferentemente, el tiempo de supervivencia promedio aumenta en más de 30 días; más preferentemente, en más de 60 días; más preferentemente, en más de 90 días; y de la manera más preferida, en más de 120 días. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir mediante cualquier medio reproducible. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia tras el inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia tras completarse una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

60 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados en comparación con una población de sujetos no tratados. Preferentemente, el tiempo de supervivencia promedio aumenta en más de 30 días; más preferentemente, en más de 60 días; más preferentemente, en más de 90 días; y de la manera más preferida, en más de 120 días. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir mediante cualquier medio reproducible. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia tras el inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio

de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia tras completarse una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

5 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto descrito en la presente. Preferentemente, el tiempo de supervivencia promedio aumenta en más de 30 días; más preferentemente, en más de 60 días; más preferentemente, en más de 90 días; y de la manera más preferida, en más de 120 días. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir mediante cualquier medio reproducible. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia tras el inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento del tiempo de supervivencia promedio de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración promedio de la supervivencia tras completarse una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

15 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe solo portador. El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población no tratada. El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto descrito en la presente. Preferentemente, la tasa de mortalidad disminuye en más de un 2%; más preferentemente, en más de un 5%; más preferentemente, en más de un 10%; y de la manera más preferida, en más de un 25%. Una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados se puede medir mediante cualquier medio reproducible. Una disminución de la tasa de mortalidad de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número promedio de fallecimientos relacionados con la enfermedad por unidad de tiempo tras el inicio del tratamiento con un compuesto activo. Una disminución de la tasa de mortalidad de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número promedio de fallecimientos relacionados con la enfermedad por unidad de tiempo tras completarse una primera ronda de tratamiento con un compuesto activo.

30 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución de la velocidad de crecimiento tumoral. Preferentemente, después del tratamiento, la velocidad de crecimiento tumoral se reduce en al menos un 5% respecto al número antes del tratamiento; más preferentemente, la velocidad de crecimiento tumoral se reduce en al menos un 10%; más preferentemente, se reduce en al menos un 20%; más preferentemente, se reduce en al menos un 30%; más preferentemente, se reduce en al menos un 40%; más preferentemente, se reduce en al menos un 50%; aún más preferentemente, se reduce en al menos un 50%; y de la manera más preferida, se reduce en al menos un 75%. La velocidad de crecimiento tumoral se puede medir mediante cualquier medio de medición reproducible. La velocidad de crecimiento tumoral se puede medir según un cambio en el diámetro del tumor por unidad de tiempo.

40 El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución del nuevo crecimiento tumoral. Preferentemente, después del tratamiento, el nuevo crecimiento tumoral es inferior a un 5%; más preferentemente, el nuevo crecimiento tumoral es inferior a un 10%; más preferentemente, inferior a un 20%; más preferentemente, inferior a un 30%; más preferentemente, inferior a un 40%; más preferentemente, inferior a un 50%; aún más preferentemente, inferior a un 50%; y de la manera más preferida, inferior a un 75%. El nuevo crecimiento tumoral se puede medir mediante cualquier medio de medición reproducible. El nuevo crecimiento tumoral se mide, por ejemplo, midiendo un aumento del diámetro de un tumor después de una contracción tumoral previa posterior al tratamiento. Una disminución en el nuevo crecimiento tumoral se pone de manifiesto por la incapacidad de los tumores de volver a aparecer tras haberse detenido el tratamiento.

50 El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo celular puede dar como resultado una reducción en la velocidad de proliferación celular. Preferentemente, después del tratamiento, la velocidad de proliferación celular se reduce en al menos un 5%; más preferentemente, en al menos un 10%; más preferentemente, en al menos un 20%; más preferentemente, en al menos un 30%; más preferentemente, en al menos un 40%; más preferentemente, en al menos un 50%; incluso más preferentemente, en al menos un 50%; y de la manera más preferida, en al menos un 75%. La velocidad de proliferación celular se puede medir mediante cualquier medio de medición reproducible. La velocidad de proliferación celular se mide, por ejemplo, midiendo el número de células que se están dividiendo en una muestra de tejido por unidad de tiempo.

55 El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo celular puede dar como resultado una reducción en la proporción de células que están proliferando. Preferentemente, después del tratamiento, la proporción de células que están proliferando se reduce en al menos un 5%; más preferentemente, en al menos un 10%; más preferentemente, en al menos un 20%; más preferentemente, en al menos un 30%; más preferentemente, en al menos un 40%; más preferentemente, en al menos un 50%; aún más preferentemente, en al menos un 50%; y de la manera más preferida, en al menos un 75%. La proporción de células que están proliferando se puede medir mediante cualquier medio de medición reproducible. Preferentemente, la proporción de células que están proliferando se mide, por ejemplo, cuantificando el número de células que se están dividiendo respecto al número de células que no se están dividiendo en una muestra de tejido. La proporción de células que están proliferando puede ser equivalente al índice mitótico.

65

El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo celular puede dar como resultado una disminución del tamaño de un área o zona de proliferación celular. Preferentemente, después del tratamiento, el tamaño de un área o zona de proliferación celular se reduce en al menos un 5% respecto a su tamaño antes del tratamiento; más preferentemente, se reduce en al menos un 10%; más preferentemente, se reduce en al menos un 20%; más preferentemente, se reduce en al menos un 30%; más preferentemente, se reduce en al menos un 40%; más preferentemente, se reduce en al menos un 50%; aún más preferentemente, se reduce en al menos un 50%; y de la manera más preferida, se reduce en al menos un 75%. El tamaño de un área o zona de proliferación celular se puede medir mediante cualquier medio de medición reproducible. El tamaño de un área o zona de proliferación celular se puede medir como el diámetro o la anchura de un área o zona de proliferación celular.

El tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo celular puede dar como resultado una reducción en el número o proporción de células que tienen una morfología o aspecto anómalo. Preferentemente, después del tratamiento, el número de células que tienen una morfología anómala se reduce en al menos un 5% respecto a su tamaño antes del tratamiento; más preferentemente, se reduce en al menos un 10%; más preferentemente, se reduce en al menos un 20%; más preferentemente, se reduce en al menos un 30%; más preferentemente, se reduce en al menos un 40%; más preferentemente, se reduce en al menos un 50%; aún más preferentemente, se reduce en al menos un 50%; y de la manera más preferida, se reduce en al menos un 75%. Una morfología o aspecto celular anómalo se puede medir mediante cualquier medio de medición reproducible. Una morfología celular anómala se puede medir mediante microscopía, por ejemplo, utilizando un microscopio para cultivo tisular invertido. Una morfología celular anómala puede adoptar la forma de un pleiomorfismo nuclear.

El término «selectivamente», tal como se utiliza en la presente, significa que tiende a producirse con una frecuencia mayor en una población que en otra población. Las poblaciones comparadas pueden ser poblaciones celulares. Preferentemente, un compuesto descrito en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) actúa selectivamente sobre una célula cancerosa o precancerosa pero no sobre una célula normal. Preferentemente, un compuesto descrito en la presente actúa selectivamente para modular una diana molecular (por ejemplo, una proteína metiltransferasa diana) pero no modula significativamente otra diana molecular (por ejemplo, una proteína metiltransferasa no diana). La invención también proporciona un método para inhibir selectivamente la actividad de una enzima, tal como una proteína metiltransferasa. Preferentemente, un evento se produce selectivamente en la población A respecto a la población B si se produce más de dos veces más frecuentemente en la población A en comparación con la población B. Un evento se produce selectivamente si se produce más de cinco veces más frecuentemente en la población A. Un evento se produce selectivamente si se produce más de diez veces más frecuentemente en la población A; más preferentemente, más de cincuenta veces; aún más preferentemente, más de 100 veces; y de la manera más preferida, más de 1000 veces más frecuentemente en la población A en comparación con la población B. Por ejemplo, se diría que se produce muerte celular selectivamente en células cancerosas si se produce con una frecuencia superior al doble en células cancerosas en comparación con células normales.

Un compuesto descrito en la presente puede modular la actividad de una diana molecular (por ejemplo, una proteína metiltransferasa diana). Modular se refiere a estimular o inhibir una actividad de una diana molecular. Preferentemente, un compuesto descrito en la presente modula la actividad de una diana molecular si estimula o inhibe la actividad de la diana molecular en al menos 2 veces respecto a la actividad de la diana molecular en las mismas condiciones pero careciendo únicamente de la presencia de dicho compuesto. Más preferentemente, un compuesto descrito en la presente modula la actividad de una diana molecular si estimula o inhibe la actividad de la diana molecular en al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces respecto a la actividad de la diana molecular en las mismas condiciones pero careciendo únicamente de la presencia de dicho compuesto. La actividad de una diana molecular se puede medir mediante cualquier medio reproducible. La actividad de una diana molecular se puede medir *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la actividad de una diana molecular se puede medir *in vitro* mediante un ensayo de actividad enzimática o un ensayo de unión a ADN, o la actividad de una diana molecular se puede medir *in vivo* evaluando la expresión de un gen indicador.

Un compuesto descrito en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) no modula de manera significativa la actividad de una diana molecular si la adición del compuesto no estimula o inhibe la actividad de la diana molecular en más de un 10% respecto a la actividad de la diana molecular en las mismas condiciones pero careciendo únicamente de la presencia de dicho compuesto.

La expresión «selectivo para la isozima», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la inhibición o estimulación preferente de una primera isoforma de una enzima en comparación con una segunda isoforma de una enzima (por ejemplo, inhibición o estimulación preferente de una isozima alfa de proteína metiltransferasa en comparación con una isozima beta de proteína metiltransferasa). Preferentemente, un compuesto descrito en la presente muestra un mínimo de un diferencial de cuatro veces, preferentemente un diferencial de diez veces, más preferentemente un diferencial de cincuenta veces, en la dosificación requerida para lograr un efecto biológico. Preferentemente, un compuesto descrito en la presente muestra este diferencial a lo largo del intervalo de inhibición, y el diferencial se ilustra en la CI_{50} , es decir, la inhibición del 50%, para una diana molecular de interés.

La administración de un compuesto descrito en la presente a una célula o a un sujeto que lo necesite puede dar como resultado la modulación (es decir, estimulación o inhibición) de una actividad de una proteína metiltransferasa de interés.

El tratamiento del cáncer o de un trastorno proliferativo celular puede dar como resultado la muerte celular, y preferentemente, la muerte celular da como resultado una disminución de al menos un 10% del número de células en una población. Más preferentemente, la muerte celular significa una disminución de al menos un 20%; más preferentemente, una disminución de al menos un 30%; más preferentemente, una disminución de al menos un 40%; más preferentemente, una disminución de al menos un 50%; de la manera más preferida, una disminución de al menos un 75%. El número de células en una población se puede medir mediante cualquier medio reproducible. El número de células en una población se puede medir mediante la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), microscopía de inmunofluorescencia y microscopía óptica. Los métodos para medir la muerte celular se muestran en Li *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5): 2674-8, 2003. En un aspecto, la muerte celular se produce por apoptosis.

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

La puesta en contacto de una célula con un compuesto descrito en la presente puede inducir o activar la muerte celular selectivamente en células cancerosas. La administración a un sujeto que lo necesite de un compuesto descrito en la presente puede inducir o activar la muerte celular selectivamente en células cancerosas. La puesta en contacto de una célula con un compuesto descrito en la presente puede inducir la muerte celular selectivamente en una o más células afectadas por un trastorno proliferativo celular. Preferentemente, la administración a un sujeto que lo necesite de un compuesto descrito en la presente induce la muerte celular selectivamente en una o más células afectadas por un trastorno proliferativo celular.

En la presente se describe un método para tratar o prevenir el cáncer (por ejemplo, la evolución del cual se puede ver influida por la modulación de la metilación de proteínas mediada por EZH2) mediante la administración de un compuesto descrito en la presente (es decir, el bromhidrato del Compuesto I, así como el Polimorfo A) a un sujeto que lo necesite, donde la administración del compuesto da como resultado uno o más de los siguientes: prevención de la proliferación de células cancerosas mediante la acumulación de las células en una o más fases del ciclo celular (por ejemplo, G1, G1/S, G2/M), o inducción de la senescencia celular, o fomento de la diferenciación de células tumorales; fomento de la muerte celular en células cancerosas mediante citotoxicidad, necrosis o apoptosis, sin una cantidad significativa de muerte celular en células normales, actividad antitumoral en animales con un índice terapéutico de al menos 2. El «índice terapéutico», tal como se utiliza en la presente, es la dosis máxima tolerada dividida por la dosis eficaz. En la presente también se describe un método utilizado para identificar candidatos adecuados para tratar o prevenir el cáncer.

Un experto en la técnica se puede remitir a textos de referencia generales para consultar descripciones detalladas de técnicas conocidas comentadas en la presente o técnicas equivalentes. Estos textos incluyen Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3.^a edición), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2000); Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna *et al.*, *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18.^a edición (1990). Obviamente, también se puede hacer referencia a estos textos a la hora de preparar o emplear un aspecto de la invención.

Ejemplificación

Materiales y métodos

Difracción de rayos X en polvo

La DRXP se registró para todas las muestras en un Rigaku MultiFlex (diana: Cu; voltaje del tubo: 40 kV; corriente del tubo: 30 mA).

Calorimetría diferencial de barrido

La CDB se registró para todas las muestras en un CDR Mettler-Toledo 1/700 (condiciones de análisis: temperatura inicial 35 °C, temp final 325 °C, velocidad de calentamiento 30 °C/min).

Cristalografía de rayos X

Se colocó un cristal laminar incoloro de dimensiones 0.28 x 0.22 x 0.06 mm sobre un bucle de nailon utilizando una cantidad muy pequeña de aceite paratone. Los datos se registraron utilizando un difractor basado en un CCD (siglas en inglés referentes a un dispositivo de acoplamiento de carga) Bruker dotado de un aparato de baja temperatura Oxford Cryostream que operaba a 173 K. Los datos se midieron utilizando barridos omega y fi de 0.5° por marco durante 45 s.

El número total de imágenes se basó en resultados del programa COSMO donde cabía esperar que la redundancia fuera de 4.0 y la completitud de un 100% hasta 0.83 Å. Los parámetros de la celda se recuperaron utilizando el software APEX II y se refinaron utilizando SAINT en todas las reflexiones observadas. Se llevó a cabo una reducción de los datos utilizando el software SAINT, el cual corrige L_p . Se aplicaron correcciones de absorción y escalado utilizando la técnica de multibarrido SADABS, suministrada por George Sheldrick. Las estructuras se resolvieron mediante el método directo utilizando el programa SHELXS-97 y se refinaron mediante el método de mínimos cuadrados en F^2 , SHELXL-97, que se incorporan en SHELXTL-PC V 6.10.

La estructura que se muestra en la Figura 11 se resolvió en el grupo espacial $P2_1/c$ (# 14). Todos los átomos que no sean hidrógeno están refinados anisotrópicamente. Los hidrógenos se calcularon mediante métodos geométricos y se refinaron como un modelo de conducción. El cristal utilizado para el estudio de difracción no mostró descomposición durante la recolección de datos. Todos los dibujos se realizaron con elipsoides de un 50%.

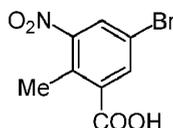
Sorción dinámica de vapor

La SDV se midió en un sistema SGA-100 modelo VTI. Método de medición: La humedad relativa (HR) se modificó de manera controlada, en pasos de un 5% desde un 5.0% hasta un 95.0% y a continuación de nuevo hasta un 5.0%, utilizando el sistema gravimétrico de sorción de vapor, y se midió el cambio en el porcentaje de peso (% p) de la muestra en cada estadio.

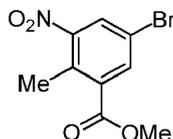
HPLC

La HPLC se llevó a cabo con una bomba cuaternaria de HPLC Agilent 1200, mezcla a baja presión, con un desgasificador en línea. Condiciones del método analítico: se inyectó una muestra de 8 μ L (20 mg de ER-581982-06 diluidos con 50 mL de metanol para proporcionar una solución de aproximadamente 0.4 mg/mL) en un Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 μ m). Condiciones de la cromatografía: fase móvil A, agua con formiato de amonio 5mM; fase móvil B, formiato de amonio 5 mM en acetonitrilo/metanol/agua 50/45/5; tasa de flujo, 1.5 mL/min; gradiente: isocrático con un 10% de B desde 0 hasta 3 min; incremento lineal hasta un 70% de B desde 3 hasta 7 min; isocrático con un 70% de B desde 7 hasta 12 min; incremento lineal hasta un 100% de B desde 12 hasta 15 min; isocrático con un 100% de B desde 15 hasta 20 min; temperatura de la columna, 35 °C; detección, UV 230 nm. Tiempo de retención aproximado del Compuesto I = 10.7 min.

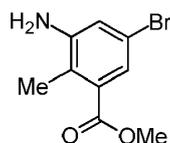
Síntesis del Polimorfo A



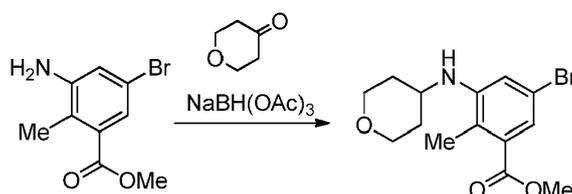
Ácido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico: A una solución agitada de ácido 2-metil-3-nitrobenzoico (100 g, 552 mmol) en H_2SO_4 conc. (400 mL), se añadió 1,3-dibromo-5,5-dimetil-2,4-imidazolidinodiona (88 g, 308 mmol) en porciones a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se vertió sobre agua enfriada con hielo, el sólido precipitado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para proporcionar el compuesto deseado como un sólido (140 g, 98%). El compuesto aislado se utilizó directamente en el siguiente paso. 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8.31 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 2.43 (s, 3H).



5-Bromo-2-metil-3-nitrobenzoato de metilo: A una solución agitada de ácido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico (285 g, 1105 mmol) en DMF (2.8 L) a temperatura ambiente, se añadió carbonato de sodio (468 g, 4415 mmol) seguido de la adición de yoduro de metilo (626.6 g, 4415 mmol). La mezcla de reacción resultante se calentó a 60 °C durante 8 h. Tras completarse (lo cual se monitorizó mediante TLC), la mezcla de reacción se filtró (para eliminar el carbonato de sodio) y se lavó con acetato de etilo (1 L X 3). El filtrado combinado se lavó con agua (3 L X 5) y la fase acuosa se extrajo de nuevo con acetato de etilo (1 L X 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (290 g, 97% de rendimiento). El compuesto aislado se utilizó directamente en el siguiente paso. 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.17 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

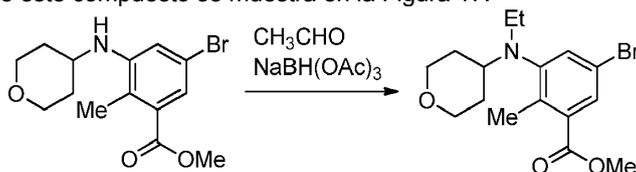


5 **3-Amino-5-bromo-2-metilbenzoato de metilo (1):** A una solución agitada de 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato de metilo (290 g, 1058 mmol) en etanol (1.5 L), se añadió cloruro de amonio acuoso (283 g, 5290 mmol disueltos en 1.5 L de agua). La mezcla resultante se agitó a 80 °C, a la cual se añadió hierro en polvo (472 g, 8451 mmol) en porciones. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante 12 h. Tras completarse, lo cual se determinó mediante TLC, la mezcla de reacción se filtró en caliente sobre celite® y el lecho de celite se lavó con metanol (5 L) seguido de un lavado con MeOH al 30% en DCM (5L). El filtrado combinado se concentró al vacío, el residuo obtenido se diluyó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio (2 L) y se extrajo con acetato de etilo (5 L X 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un sólido (220 g, 85%). El compuesto se utilizó directamente en el siguiente paso. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.37 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 (s a, 2H), 2.31 (s, 3H).

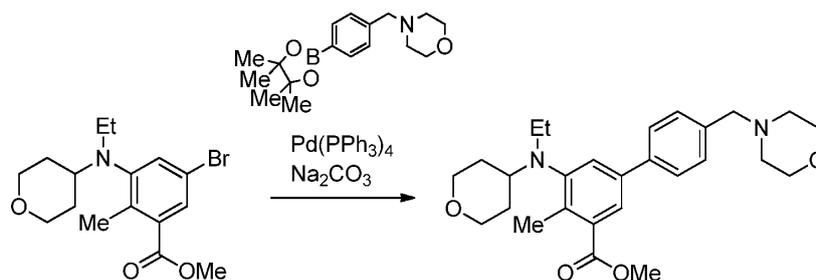


15 **5-Bromo-2-metil-3-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino) benzoato de metilo (2):** En un reactor, se introdujo 3-amino-5-bromo-2-metilbenzoato de metilo (455.8 g, 1.87 mol), 1,2-dicloroetano (4.56 L) y ácido acético (535 mL, 9.34 mol). Se añadieron a la mezcla dihidro-2H-piran-4(3H)-ona (280 g, 2.80 mol) y triacetoxiborohidruro de sodio (594 g, 2.80 mol), manteniendo la temperatura interna por debajo de 40 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2.5 h y a continuación la reacción se desactivó con una solución de hidróxido de sodio (448 g, 11.20 mol) en agua (5.61 L). Después de agitar durante 20 minutos a temperatura ambiente, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3.65 L). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (1.5 L) y se concentraron al vacío.

20 El residuo se trató con acetato de etilo (1.8 L) y se calentó hasta 65-70 °C. La mezcla se agitó a 65-70 °C durante 15 minutos para obtener una solución transparente y a continuación se trató con *n*-heptano (7.3 L), manteniendo la temperatura entre 60-70 °C. Una vez que el heptano se añadió completamente a la solución, la mezcla se mantuvo a 65-70 °C durante 15 minutos y a continuación se permitió que se enfriara hasta 18-22 °C durante 3 h. La suspensión resultante se agitó a 18-22 °C durante 4 h, se enfrió hasta 0-5 °C durante 1 h y se mantuvo a 0-5 °C durante 2 h. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con *n*-heptano (1.4 L) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título (540 g, 88%). El patrón de DRXP de este compuesto se muestra en la Figura 17.

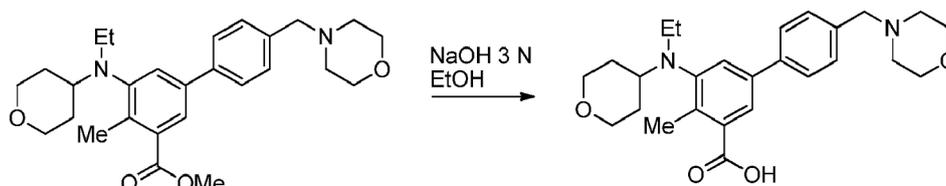


30 **5-Bromo-3-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-2-metilbenzoato de metilo (3):** A una solución agitada de 5-bromo-2-metil-3-((tetrahydro-2H-piran-4-il) amino)benzoato de metilo (14 g, 42.7 mmol) en diclorometano (150 mL), se añadió acetaldehído (3.75 g, 85.2 mmol) y ácido acético (15.3 g, 256 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (27 g, 128 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras completarse la reacción, lo cual se determinó mediante TLC, se añadió una solución acuosa de bicarbonato de sodio a la mezcla de reacción hasta obtener un pH de 7-8, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El compuesto crudo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice de malla 100-200) eluyendo con acetato de etilo: hexano para proporcionar el compuesto deseado como un líquido viscoso (14 g, 93%). ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 7.62 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 3.80 (s a, 5H), 3.31 (t, 2H), 2.97-3.05 (m, 2H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.52-1.61 (m, 2H), 1.37-1.50 (m, 2H), 0.87 (t, 3H, J=6.8 Hz).



5 **5-(Etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de metilo (4):** Una mezcla de 5-bromo-3-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-2-metilbenzoato de metilo (580 g, 1.63 mol), 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)encil)morfolina (592 g, 1.95 mol), 1,4-dioxano (3.86 L), carbonato de sodio (618 g, 5.83 mol) y agua (771 mL) se desgasificó haciendo burbujear nitrógeno a través de la mezcla a 20 °C durante 20 minutos y se trató con tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (14.11 g, 12.21 mmol). La mezcla resultante se desgasificó durante 20 minutos adicionales y a continuación se calentó hasta 87-89 °C durante 17 h. Después de enfriar hasta 20 °C, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (5.80 L) y una solución de ácido (R)-2-amino-3-mercaptopropiónico (232 g) en agua (2.320 L). Después de agitar durante 1 h a 20 °C, la fase orgánica se separó y se lavó de nuevo con una solución de ácido (R)-2-amino-3-mercaptopropiónico (232 g) en agua (2.320 L). Las fases acuosas se combinaron y se extrajeron con acetato de etilo (5.80 L). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con una solución de hidróxido de sodio (93 g) en agua (2.32 L) y se concentraron al vacío a 35 °C para obtener el compuesto del título como un aceite naranja (1.21 kg, 164% de rendimiento).

15



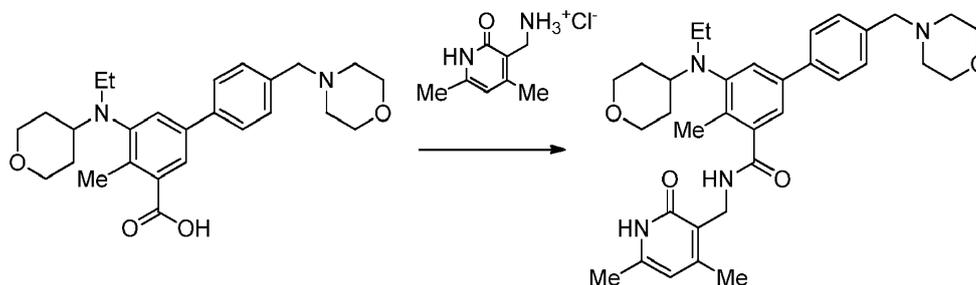
20

Ácido 5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico (5): Se suspendió 5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxilato de metilo (69.0 g, 152.5 mmol) (basándose en el rendimiento teórico del paso previo) en etanol (380 mL) y se trató con una solución de hidróxido de sodio (24.84 g, 621.0 mmol) en agua (207 mL). La mezcla se agitó a 40 °C durante 18 h. Después de enfriar hasta 0-5 °C, la mezcla se neutralizó hasta un pH de 6.5 con ácido clorhídrico 1 N (580 mL), manteniendo la temperatura por debajo de 25 °C. A continuación, la mezcla se extrajo dos veces con una mezcla de diclorometano (690 mL) y metanol (69.0 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron al vacío para obtener un producto crudo como un sólido amarillo (127g).

25

El producto crudo se disolvió en 2-metiltetrahidrofurano (656 mL) a 70 °C y a continuación se trató con IPA (828 mL). Se permitió que la mezcla se enfriara hasta ta durante 3-4 h y a continuación se agitó durante toda la noche a ta. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con IPA (207 mL) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (53.54 g, 80%). El patrón de DRXP de este compuesto se muestra en la Figura 9.

30

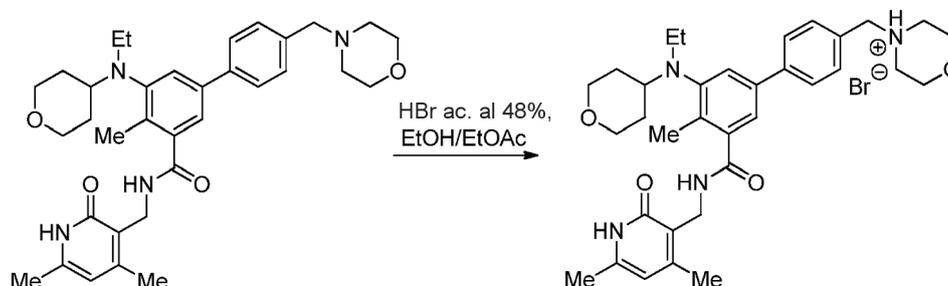


35

N-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida (Compuesto I): Una mezcla de ácido 5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxílico (540 g, 1.23 mol) y clorhidrato de 3-(aminometil)-4,6-dimetildihidropiridin-2(1H)-ona (279 g, 1.48 mol) se suspendió en DMSO (2.70 L) y se trató con trietilamina (223 mL, 1.60 mol). La mezcla se agitó a 25 °C durante 30 min y se trató con EDCI-HCl (354 g, 1.85 mol) y HOBt hidratado (283 g, 1.85 mol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 16 h. Después de la adición de trietilamina (292 mL, 2.09 mol), la mezcla se enfrió hasta 15 °C, se diluyó con agua (10.1 L), manteniendo la temperatura por debajo de 30 °C, y se agitó a 19-25 °C durante 4 h. El precipitado resultante se filtró, se lavó dos veces con agua (2.70 L) y se secó al vacío para obtener un producto crudo (695 g, análisis de p-p = 78%).

40

Para la purificación adicional del producto, se llevó a cabo una recrystalización. Se suspendió un producto crudo (20.00 g, 34.92 mmol) en una mezcla de etanol (190 mL) y agua (10.00 mL) y se calentó hasta 75 °C hasta que se obtuvo una solución transparente. Se permitió que la solución se enfriara hasta ta durante toda la noche. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con una mezcla de etanol (30.0 mL) y agua (30.0 mL), y se secó al vacío a 35 °C para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (14.0 g, 70% de recuperación a partir del crudo y 90% de rendimiento basándose en un ensayo de p-p).



Bromuro de 4-((3'-(((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamoyl)-5'-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)morfolin-4-io (Polimorfo A): Se suspendió *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida (595 g, 464 g basándose en un ensayo de p-p, 810.3 mmol) en etanol (3.33 L). Después de calentar hasta 70 °C, la mezcla se trató con HBr acuoso al 48% (97 mL, 850.8 mmol) y se agitó a 70 °C durante 30 min. La solución de color naranja-rojo resultante se trató con acetato de etilo (3.33 L), manteniendo la temperatura por encima de 60 °C. La mezcla se enfrió lentamente hasta ta durante 18 h. La mezcla se enfrió hasta 0 °C durante 1 h y se agitó a esa temperatura durante 5.5 h. El precipitado resultante se filtró, se lavó dos veces con acetato de etilo (1.39 L) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blanquecino (515 g, 97% de rendimiento).

Recrystalización del Polimorfo A: Se suspendió bromuro de 4-((3'-(((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamoyl)-5'-(etil(tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)-4'-metil-[1,1'-bifenil]-4-il)metil)morfolin-4-io (0.50 g, 0.77 mmol; 95.6% de pureza según HPLC) en etanol (3.0 mL) y se calentó hasta 80 °C hasta que se obtuvo una solución transparente. Se añadió MTBE (5.0 mL) lentamente a la solución. Se permitió que la solución resultante se enfriara hasta 18-22 °C durante 3 h y se agitó a 18-22 °C durante 15 h. El precipitado se filtró, se lavó dos veces con MTBE (2 mL) y se secó al vacío para obtener 0.45 g del compuesto del título (89% de recuperación, 96.6% de pureza según HPLC). El patrón de difracción de rayos X en polvo del Polimorfo A (monobromhidrato) se muestra en la Figura 1. La Tabla 1 siguiente enumera los picos más significativos.

Tabla 1

Picos (grados 2-theta)
3.9
10.1
14.3
17.5
18.7
20.6
20.9
21.8
22.0
23.3
23.6

30 Evaluación del bromhidrato del Compuesto I y el Polimorfo A

Se prepararon una serie de formas salinas diferentes del Compuesto I y se cribaron, las cuales incluyeron sales de tipo clorhidrato, bromhidrato, hemisulfato, sodio, fosfato, nitrato, maleato, malonato y L-tartrato. Entre ellas, la sal de tipo bromhidrato (HBr) presentó las propiedades fisicoquímicas más favorables en cuanto a su facilidad de preparación e higroscopicidad.

Se llevaron a cabo estudios detallados de la base libre del Compuesto I, así como de la sal de HCl de este compuesto. Se detectaron al menos cinco formas cristalinas diferentes de la forma libre del Compuesto I durante un cribado preliminar de polimorfos utilizando DRX y CDB. Debido al elevado grado de variabilidad que se observó durante la cristalización de la forma libre, se buscaron formas cristalinas de otras sales. De las sales cribadas, las formas salinas de tipo monoclorhidrato, monobromhidrato, hemisulfato, fosfato, maleato, L-tartrato y sodio fueron cristalinas. Las sales de fosfato y maleato fueron muy higroscópicas y el L-tartrato presentó poca cristalinidad.

Fue difícil obtener un elevado grado de cristalinidad para la sal de HCl del Compuesto I. Se obtuvo una mezcla de material cristalino y amorfo independientemente de las condiciones de cristalización. Según se muestra en la Figura 8, los datos de CDB de la sal de tipo monoclorhidrato del Compuesto I indican cierto grado de no cristalinidad con una endoterma a 190.5 °C. Además, se obtuvieron datos de sorción dinámica de vapor (SDV) para la sal de tipo monoclorhidrato del Compuesto I y se observó que presentaba cierta higroscopicidad: se observó entre un 4 - 6% de aumento de peso para una humedad relativa (HR) de un 75% a 25 °C (Figura 18B). Esto se puede atribuir a cierta cantidad de naturaleza no cristalina de la sal de tipo monoclorhidrato. Remítase, por ejemplo, a la Figura 18A, la cual muestra un triclorhidrato del Compuesto I amorfo. Debido a que el nivel de cristalinidad no se pudo controlar, la sal de HCl no se consideró para un desarrollo adicional.

Según se muestra en la Figura 6, el análisis de SDV de la sal de sodio del Compuesto I mostró una higroscopicidad significativa: se observó aproximadamente un 15% de aumento de peso para una humedad relativa (HR) de un 75% a 25 °C. Según se muestra en la Figura 7, la sal de tipo hemisulfato del Compuesto I presentó una higroscopicidad moderadamente elevada: se observó entre un 9 - 11% de aumento de peso para una humedad relativa (HR) de un 75% a 25 °C. Esto se puede atribuir a la naturaleza altamente no cristalina del compuesto, ya que los datos de CDB de la sal de tipo en hemisulfato indican un grado muy elevado de no cristalinidad sin una endoterma clara.

De entre estos compuestos cristalinos, el monobromhidrato fue el más cristalino y menos higroscópico (remítase a las Figuras 1, 3 y 4). Además, el monobromhidrato es altamente estable y resiste la generación de impurezas (la Figura 5 representa el análisis por HPLC del Polimorfo A durante tres días a una temperatura elevada. El Polimorfo A produjo unas impurezas mínimas durante tres días a 100 °C). Cabe destacar que se observó que la sal de tipo di-HBr del Compuesto I era mayoritariamente amorfa (Figura 2).

Se obtuvieron dos formas cristalinas diferentes del monobromhidrato del Compuesto I (Polimorfos A y B) a partir de diferentes sistemas de disolventes y se caracterizaron utilizando análisis de DRX, CDB y ATG-CDB. Los datos de DRX y CDB para estas dos formas cristalinas diferentes procedentes de lotes representativos del Compuesto I se muestran en la Figura 1, Figura 3 y Figura 10. El Polimorfo B se caracteriza por un patrón de DRX en polvo con picos en 8.5, 10.9, 16.7, 17.4, 20.9, 22.1 y 25.7 ±0.2 grados 2 theta (remítase a la Figura 10). Entre estos dos, se observó que el Polimorfo A tenía una naturaleza más cristalina. Los estudios de adsorción dinámica de vapor (SDV) mostraron que el polimorfo A no es higroscópico (Figura 4). En los análisis térmicos, se observó un único pico endotérmico con una temperatura de inicio a aproximadamente 251 °C. Además, resultó evidente a partir del análisis de CDB que la recristalización del polimorfo A incrementa significativamente la cristalinidad del material (remítase a la Figura 3).

En múltiples experimentos de escalado en el laboratorio, se obtuvo el Polimorfo A de forma reproducible y pequeños cambios en las condiciones de cristalización no dieron como resultado diferentes formas cristalinas.

Ensayos enzimáticos de PRC2 mutado y de origen natural

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

Sustratos. Se sintetizaron péptidos representativos de los residuos 21 - 44 de la histona H3 humana que contenían o bien lisina 27 no modificada (H3K27me0) o lisina 27 dimetilada (H3K27me2) con un motivo de marca de afinidad-conector G (K-biotina) C-terminal y una terminación de amida C-terminal de 21st Century Biochemicals. Los péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) hasta obtener una pureza superior al 95%, lo cual se confirmó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Las secuencias se enumeran a continuación.

H3K27me0: ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotina)-amida (SEQ ID NO: 1)

H3K27me2: ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotina)-amida (SEQ ID NO: 2)

Se purificaron oligonucleosomas de eritrocitos de pollo a partir de sangre de pollo de acuerdo con procedimientos establecidos.

Complejos de PRC2 recombinantes. Se purificaron complejos de PRC2 humanos como complejos enzimáticos de 4 componentes coexpresados en células de *Spodoptera frugiperda* (sf9) utilizando un sistema de expresión de baculovirus. Las subunidades expresadas fueron EZH2 de origen natural (NM_004456) o los mutantes Y641F, N, H, S o C de EZH2

generados a partir del constructo de EZH2 de origen natural, EED (NM_003797), Suz12 (NM_015355) y RbAp48 (NM_005610). La subunidad EED contenía una marca FLAG N- terminal que se utilizó para purificar el complejo de 4 componentes entero a partir de los lisados de células sf9. La pureza de los complejos llegó o fue superior a un 95%, según se determinó mediante análisis de SDS-PAGE y el bioanalizador de Agilent. Las concentraciones para las concentraciones del patrón enzimático (por lo general 0.3 - 1.0 mg/mL) se determinaron utilizando el ensayo Bradford frente a un patrón de albúmina de suero bovino (BSA).

Procedimiento general para ensayos enzimáticos de PRC2 sobre sustratos peptídicos. Los ensayos se realizaron todos en un tampón que consistía en bicina 20 mM (pH = 7.6), DTT 0.5 mM, BSG al 0.005% y Tween 20 al 0.002%, preparado el día de su uso. Los compuestos en DMSO al 100% (1 μ L) se aplicaron puntualmente en placas de polipropileno de fondo en V de 384 pocillos (Greiner) utilizando un Platemate 2 X 3 dotado de un cabezal de pipetas de 384 canales (Thermo). Se añadió DMSO (1 μ L) a las columnas 11, 12, 23, 24, filas A-H para el control de señal máxima y se añadió SAH, un producto conocido e inhibidor de PRC2 (1 μ L), a las columnas 11,12, 23, 24, filas I-P para el control de señal mínima. Se añadió un cóctel (40 μ L) que contenía la enzima PRC2 de origen natural y el péptido H3K27me0 o cualquiera de las enzimas mutadas Y641 y el péptido H3K27me2 mediante Multidrop Combi (Thermo). Se permitió que los compuestos se incubaran con PRC2 durante 30 min a 25 °C, después se añadió un cóctel (10 μ L) que contenía una mezcla de SAM no radioactivo y 3 H-SAM para iniciar la reacción (volumen final = 51 μ L). En todos los casos, las concentraciones finales fueron las siguientes: para la enzima PRC2 de origen natural o mutada fue 4 nM, para SAH en los pocillos de control de señal mínima fue 1 mM y la concentración de DMSO fue de un 1%. Las concentraciones finales del resto de los componentes se indican en la Tabla 2 a continuación. Los ensayos se detuvieron mediante la adición de SAM no radiactivo (10 μ L) hasta una concentración final de 600 μ M, que diluye el 3 H-SAM hasta un nivel donde su incorporación en el sustrato peptídico ya no es detectable. Después se transfirieron 50 μ L de la reacción en la placa de polipropileno de 384 pocillos a una Flashplate de 384 pocillos y se permitió que los péptidos biotinilados se unieran a la superficie de estreptavidina durante al menos 1 h antes de lavarse tres veces con Tween20 al 0.1% en un lavaplaques Biotek ELx405. A continuación, las placas se leyeron en un lector de placas PerkinElmer TopCount para medir la cantidad de péptido marcado con 3 H unido a la superficie de Flashplate, medida como desintegraciones por minuto (dpm) o, como alternativa, a la que se hace referencia como recuentos por minuto (cpm).

Tabla 2: Concentraciones finales de los componentes para cada variación del ensayo basándose en la identidad de EZH2 (EZH2 de origen natural o Y641 mutado)

Enzima PRC2 (denominada según la identidad e EZH2)	Péptido (nM)	SAM no radioactivo (nM)	3 H-SAM (nM)
De origen natural	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

Procedimiento general para el ensayo enzimático de PRC2 de origen natural sobre un sustrato oligonucleosómico.

Los ensayos se realizaron en un tampón que consistía en bicina 20 mM (pH = 7.6), DTT 0.5 mM, BSG al 0.005%, KCl 100 mM y Tween 20 al 0.002%, preparado el día de su uso. Los compuestos en DMSO al 100% (1 μ L) se aplicaron puntualmente en placas de polipropileno de fondo en V de 384 pocillos (Greiner) utilizando un Platemate 2 X 3 dotado de un cabezal de pipetas de 384 canales (Thermo). Se añadió DMSO (1 μ L) a las columnas 11, 12, 23, 24, filas A-H para el control de señal máxima y se añadió SAH, un producto conocido e inhibidor de PRC2 (1 μ L), a las columnas 11,12, 23, 24, filas I-P para el control de señal mínima. Se añadió un cóctel (40 μ L) que contenía la enzima PRC2 de origen natural y oligonucleosoma de eritrocitos de pollo mediante Multidrop Combi (Thermo). Se permitió que los compuestos se incubaran con PRC2 durante 30 min a 25 °C, después se añadió un cóctel (10 μ L) que contenía una mezcla de SAM no radioactivo y 3 H-SAM para iniciar la reacción (volumen final = 51 μ L). Las concentraciones finales fueron las siguientes: para la enzima PRC2 de origen natural fue 4 nM, para SAM no radiactivo fue 430 nM, para 3 H-SAM fue 120 nM, para el oligonucleosoma de eritrocitos de pollo fue 120 nM, para SAH en los pocillos de control de señal mínima fue 1 mM y la concentración de DMSO fue de un 1%. El ensayo se detuvo mediante la adición de SAM no radiactivo (10 μ L) hasta una concentración final de 600 μ M, que diluye el 3 H-SAM hasta un nivel donde su incorporación en el sustrato de oligonucleosoma de eritrocitos de pollo ya no es detectable. Después se transfirieron 50 μ L de la reacción en la placa de polipropileno de 384 pocillos a una Flashplate de 384 pocillos y los nucleosomas de eritrocitos de pollo se inmovilizaron sobre la superficie de la placa, la cual se lavó a continuación tres veces con Tween20 al 0.1% en un lavaplaques Biotek ELx405. A continuación, las placas se leyeron en un lector de placas PerkinElmer TopCount para medir la cantidad de oligonucleosoma de eritrocitos de pollo marcado con 3 H unido a la superficie de Flashplate, medida como desintegraciones por minuto (dpm) o, como alternativa, a la que se hace referencia como recuentos por minuto (cpm).

Cálculo del % de inhibición

$$\% \text{ de inh.} = 100 - \left(\frac{\text{dpm}_{\text{comp.}} - \text{dpm}_{\text{mín.}}}{\text{dpm}_{\text{máx.}} - \text{dpm}_{\text{mín.}}} \right) \times 100$$

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

5

Ajuste de CI_{50} de cuatro parámetros

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

10

Donde superior e inferior son normalmente flotantes, pero pueden fijarse a 100 o 0 respectivamente en un ajuste de 3 parámetros. El coeficiente de Hill normalmente es flotante, pero también puede fijarse a 1 en un ajuste de 3 parámetros. Y es el % de inhibición y X es la concentración del compuesto.

Los valores de CI_{50} para los ensayos enzimáticos de PRC2 sobre sustratos peptídicos (por ejemplo, EZH2 de origen natural y Y641F) se presentan en la Tabla 3 más adelante.

15

Ensayo de metilación de WSU-DLCL2

20

Se adquirieron células en suspensión WSU-DLCL2 de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares, Braunschweig, Alemania). El medio RPMI/Glutamax, la penicilina-estreptomicina, el suero bovino fetal desactivado térmicamente y D-PBS se adquirieron de Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU. El tampón de extracción y el tampón de neutralización (5X) se adquirieron de Active Motif, Carlsbad, CA, EE. UU. El anticuerpo anti-histona H3 de conejo se adquirió de Abcam, Cambridge, MA, EE. UU. El anticuerpo anti-H3K27me3 de conejo y anti-IgG de conejo conjugado con HRP se adquirieron de Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU. El sustrato TMB «supersensible» fue suministrado por BioFX Laboratories, Owings Mills, MD, EE. UU. La albúmina de suero bovino exenta de IgG se adquirió de Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU. El PBS con Tween (10X PBST) se adquirió de KPL, Gaithersburg, MD, EE. UU. El ácido sulfúrico se adquirió de Ricca Chemical, Arlington, TX, EE. UU. Las placas para ELISA Immulon se adquirieron de Thermo, Rochester, NY, EE. UU. Las placas de cultivo celular con fondo en V se adquirieron de Corning Inc., Corning, NY, EE. UU. Las placas de polipropileno con fondo en V se adquirieron de Greiner Bio-One, Monroe, NC, EE. UU.

30

Se mantuvieron células en suspensión WSU-DLCL2 en medio de crecimiento (RPMI 1640 suplementado con un 10% v/v de suero bovino fetal desactivado térmicamente y 100 unidades/mL de penicilina-estreptomicina) y se cultivaron a 37 °C con un 5% de CO_2 . En las condiciones del ensayo, las células se incubaron en medio de ensayo (RPMI 1640 suplementado con un 20% v/v de suero bovino fetal desactivado térmicamente y 100 unidades/mL de penicilina-estreptomicina) a 37 °C con un 5% de CO_2 en un agitador de placas.

35

40

Las células WSU-DLCL2 se sembraron en medio de ensayo con una concentración de 50 000 células por mL en una placa de cultivo celular con fondo en V de 96 pocillos con 200 μ L por pocillo. Se añadió compuesto (1 μ L) procedente de placas fuente de 96 pocillos directamente a la placa de células con fondo en V. Las placas se incubaron en un agitador de placas de titulación a 37 °C con un 5% de CO_2 durante 96 horas. Después de cuatro días de incubación, las placas se centrifugaron a 241 x g durante cinco minutos y se aspiró cuidadosamente el medio de cada pocillo de la placa de células sin perturbar el pellet celular. El pellet se suspendió de nuevo en 200 μ L de DPBS y las placas se centrifugaron de nuevo a 241 x g durante cinco minutos. Se aspiró el sobrenadante y se añadió tampón de extracción frío (4 °C) (100 μ L) en cada pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C en un agitador orbital durante dos horas. Las placas se centrifugaron a 3427 x g x 10 minutos. El sobrenadante (80 μ L por pocillo) se transfirió a su pocillo respectivo en una placa de polipropileno con fondo en V de 96 pocillos. Se añadió tampón de neutralización 5X (20 μ L por pocillo) a la placa de polipropileno con fondo en V que contenía el sobrenadante. Se incubaron placas de polipropileno con fondo en V que contenían un preparado de histona crudo (CHP, por sus siglas en inglés) en un agitador orbital durante cinco minutos. Los preparados de histona crudos se añadieron (2 μ L por pocillo) a cada pocillo respectivo en placas para ELISA de 96 pocillos por duplicado que contenían 100 μ L de tampón de recubrimiento (1X PBS + BSA al 0.05% p/v). Las placas se sellaron y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con 300 μ L por pocillo de 1X PBST. Los pocillos se bloquearon durante dos horas con 300 μ L por pocillo de diluyente para ELISA ((PBS (1X) BSA (2% p/v) y Tween20 (0.05% v/v)). Las placas se lavaron tres veces con 1X PBST. Para la placa de detección de la histona H3, se añadieron 100 μ L por pocillo del anticuerpo anti-histona H3 (Abcam, ab1791) diluido con un factor de 1:10 000 en diluyente para ELISA. Para la placa de detección de la trimetilación de H3K27, se añadieron 100 μ L por pocillo de anti-H3K27me3 diluido con un factor de 1:2000 en diluyente para ELISA. Las placas se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 μ L de 1X PBST por pocillo. Para la detección de la histona H3, se añadieron 100 μ L por pocillo de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP diluido hasta un factor de 1:6000 en diluyente para ELISA. Para la detección de H3K27me3, se añadieron 100 μ L por pocillo de anticuerpo anti-IgG de conejo

55

conjugado con HRP diluido hasta un factor de 1:4000 en diluyente para ELISA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las placas se lavaron cuatro veces con 300 μ L de 1X PBST por pocillo. Se añadieron 100 μ L de sustrato TMB por pocillo. Las placas de histona H3 se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente. Las placas de H3K27me3 se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 N (100 μ L por pocillo). Se leyó la absorbancia para cada placa a 450 nm.

En primer lugar, se determinó la relación para cada pocillo mediante:

$$\left(\frac{\text{Valor de DO450 para H3K27me3}}{\text{Valor de DO450 para la histona H3}} \right)$$

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

Se calculó el promedio de los valores de relación para cada tipo de control y se utilizó para determinar el porcentaje de inhibición para cada pocillo de ensayo en la placa. El compuesto de prueba se diluyó en serie con un factor de tres en DMSO para obtener un total de diez concentraciones de prueba, empezando en 25 μ M. Se determinó el porcentaje de inhibición y se generaron curvas de CI_{50} utilizando pocillos por duplicado para cada concentración de compuesto. Los valores de CI_{50} para este ensayo se presentan en la Tabla 3 más adelante.

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left(\frac{(\text{Relación de la muestra de prueba individual}) - (\text{Relación promedio de referencia})}{(\text{Relación de inhibición mínima}) - (\text{Relación promedio de referencia})} \right) * 100$$

Análisis de proliferación celular

Se adquirieron células en suspensión WSU-DLCL2 de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares, Braunschweig, Alemania). El medio RPMI/Glutamax, la penicilina-estreptomicina y el suero bovino fetal desactivado térmicamente se adquirieron de Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU. Las placas de 384 pocillos de polipropileno con fondo en V se adquirieron de Greiner Bio-One, Monroe, NC, EE. UU. Las placas opacas blancas de 384 pocillos para cultivo celular se adquirieron de Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU. Cell-Titer Glo® se adquirió de Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU. El lector de placas SpectraMax M5 se adquirió de Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EE. UU.

Se mantuvieron células en suspensión WSU-DLCL2 en medio de crecimiento (RPMI 1640 suplementado con un 10% v/v de suero bovino fetal desactivado térmicamente) y se cultivaron a 37 °C con un 5% de CO₂. En las condiciones del ensayo, las células se incubaron en medio de ensayo (RPMI 1640 suplementado con un 20% v/v de suero bovino fetal desactivado térmicamente y 100 unidades/mL de penicilina-estreptomicina) a 37 °C con un 5% de CO₂.

Para la evaluación del efecto de los compuestos sobre la proliferación de la línea celular WSU-DLCL2, se colocaron células en crecimiento exponencial en placas opacas blancas de 384 pocillos con una densidad de 1250 células/mL en un volumen final de 50 μ L de medio de ensayo. Se preparó una placa fuente de compuesto realizando diluciones en serie con un factor de 3 de nueve puntos por triplicado en DMSO, empezando con 10 mM (la concentración superior final de compuesto en el ensayo fue 20 μ M y la de DMSO fue de un 0.2%). Se añadió una alícuota de 100 nL procedente de la placa patrón de compuesto a su pocillo respectivo en la placa de células. El control de 100% de inhibición consistió en células tratadas con una concentración final 200 nM de estaurosporina y el control de 0% de inhibición consistió en células tratadas con DMSO. Tras la adición de los compuestos, las placas de ensayo se incubaron durante 6 días a 37 °C con un 5% de CO₂ y una humedad relativa > 90% durante 6 días. La viabilidad celular se midió cuantificando el ATP presente en los cultivos celulares, añadiendo 35 μ L de reactivo Cell Titer Glo® a las placas de células. Se leyó la luminiscencia en un SpectraMax M5. Se determinó la concentración que inhibía la viabilidad celular en un 50% utilizando un ajuste de 4 parámetros de las curvas de dosis-respuesta normalizadas. Los valores de CI_{50} para este ensayo se presentan en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

	CI_{50} de EZH2, péptido v2	CI_{50} de Y641F	CI_{50} de WSU prolif	CI_{50} de WSU ELISA
Compuesto I (base libre)	0.01299	0.01107	0.369	0.29

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

Ratones

Los ratones Fox Chase SCID® hembra (CB 17/1cr-Prkdcscid/1cr1coCr1, Beijing Vitalriver Laboratory Animal Co., LTD) tenían 6 - 8 semanas de edad y un intervalo de pesos corporales (BW, por sus siglas en inglés) de 16.0-21.1 g el D1 del

estudio. Se ofreció a los animales agua (solución salina estéril) y comida en gránulos seca esterilizada por irradiación *ad libitum*. Los ratones se alojaron en lechos de mazorcas de maíz en microaisladores estáticos durante un ciclo de luz de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y una humedad de un 40-60%. Todos los procedimientos cumplieron con las recomendaciones de la *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* respecto a la contención, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de la alimentación y el fluido, y atención veterinaria.

Cultivo de células tumorales

La línea celular de linfoma humano SUDHL10 se obtuvo de DSMZ y se mantuvo en CRO como cultivos en suspensión en medio RPMI-1640 que contenía 100 unidades/mL de sal sódica de penicilina G, 100 g/mL de estreptomycin y suero bovino fetal al 10%. Las células se cultivaron en frascos de cultivo tisular en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Únicamente los cultivos por debajo del pasaje 12 se utilizaron para el implante.

Implante del tumor *in vivo*

La línea celular de linfoma humano SUDHL10 se recolectó durante el crecimiento en fase mid-log y se suspendió de nuevo en PBS con Matrigel™ al 50% (BD Biosciences). Cada ratón recibió 1 x 10⁷ células (0.2 mL de suspensión celular) por vía subcutánea en el flanco derecho. Los tumores se midieron con un calibre en dos dimensiones para monitorizar su crecimiento a medida que el volumen medio se acercaba al intervalo deseado de 80-120 mm³. El tamaño del tumor, en mm³, se calculó a partir de:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

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

Artículos de prueba

El bromhidrato del Compuesto I se almacenó a temperatura ambiente y protegido de la luz. En cada día de tratamiento, se prepararon formulaciones frescas del compuesto suspendiendo el polvo en carboximetilcelulosa sódica (NaCMC) al 0.5% y Tween® 80 al 0.1% en agua desionizada. El vehículo, NaCMC al 0.5% y Tween® 80 al 0.1% en agua desionizada, se utilizó para tratar el grupo de control siguiendo el mismo programa. Las formulaciones se almacenaron fuera del alcance de la luz a 4 °C antes de su administración.

Plan de tratamiento

Los ratones se trataron con dosis del bromhidrato del Compuesto I comprendidas en el intervalo de 125 - 500 mg/kg y siguiendo programas de tipo BID (dos veces al día cada 12 h) durante 28 días mediante sonda oral. Cada dosis se suministró en un volumen de 0.2 mL/20 g de ratón (10 mL/kg) y se ajustó para el último peso registrado de los animales individuales. El día 25, los 8 ratones con los tumores más pequeños por grupo se seleccionaron para un criterio de evaluación de retraso del crecimiento tumoral (observación hasta 60 días). Los animales restantes fueron sacrificados el día 28, 3 h después de la última dosis para la recolección del tumor.

Análisis del volumen tumoral mediano (MTV, por sus siglas en inglés) y de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés)

La eficacia del tratamiento se determinó en el último día de tratamiento. Se determinó MTV(*n*), el volumen tumoral mediano para el número de animales, *n*, evaluable en el último día, para cada grupo. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI) se puede definir de varias maneras. En primer lugar, la diferencia entre el MTV(*n*) del grupo de control designado y el MTV(*n*) del grupo tratado con el fármaco se expresa como un porcentaje del MTV(*n*) del grupo de control:

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

Otra manera de calcular el % de TGI es teniendo en cuenta el cambio del tamaño tumoral desde el día 1 hasta el día *n*, siendo *n* el último día de tratamiento.

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

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

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

Análisis del retraso del crecimiento tumoral

Se mantuvieron con vida ocho ratones por grupo después del último día de tratamiento para realizar el análisis del retraso del crecimiento tumoral. Los tumores se midieron con un calibre dos veces a la semana y se sacrificó cada animal de prueba cuando su neoplasia alcanzó el volumen del criterio de valoración de 2000 mm³ o el último día preespecificado del estudio, lo que sucediera primero. Se llevó a cabo un análisis de supervivencia de Kaplan Meier.

Toxicidad

Los animales se pesaron a diario en los Días 1-5 y a continuación dos veces a la semana hasta que se completó el estudio. Los ratones fueron examinados frecuentemente en busca de signos evidentes de cualesquiera efectos secundarios adversos relacionados con el tratamiento, los cuales fueron documentados. La toxicidad aceptable para la dosis tolerada máxima (MTD, por sus siglas en inglés) se definió como una pérdida de BW media de grupo inferior al 20% durante la prueba y no más de un 10% de mortalidad debida a fallecimientos TR. Una muerte se clasificó como TR si se pudo atribuir a efectos secundarios del tratamiento, lo cual se puso de manifiesto mediante signos clínicos y/o necropsia, o si fue debida a causas desconocidas durante el periodo de dosificación. Una muerte se clasificó como NTR si hubo evidencias de que el fallecimiento no estaba relacionado con efectos secundarios del tratamiento. Los fallecimientos NTR durante el intervalo de dosificación se clasificarían habitualmente como NTRa (debidos a un accidente o error humano) o NTRm (debidos a una diseminación del tumor confirmada por necropsia mediante invasión y/o metástasis). Los animales tratados por vía oral que fallecieron debido a causas desconocidas durante el periodo de dosificación se pueden clasificar como NTRu cuando el comportamiento del grupo no cumple con una clasificación TR y la necropsia, para descartar un error de dosificación, no es posible.

Muestreo

El día 28 se tomaron muestras de ocho ratones con los tumores más grandes de un modo preespecificado para evaluar la inhibición diana en los tumores. Los tumores se recolectaron a partir de ratones especificados en condiciones exentas de RNasa y se bisecaron. Se midió el peso total del tumor. El tejido tumoral congelado de cada animal se congeló instantáneamente en N₂ líquido y se pulverizó con un mortero.

Análisis gráficos y estadísticos

Todos los análisis gráficos y estadísticos se llevaron a cabo con Prism 3.03 (GraphPad) para Windows. Para evaluar la significancia estadística entre los grupos tratados y de control durante todo el transcurso del tratamiento, se empleó una prueba de ANOVA de mediciones repetidas seguida de una posprueba de comparación múltiple de Dunnet. Prism registra los resultados como no significativos (ns) para $P > 0.05$, significativos (simbolizados con «*») para $0.01 < P < 0.05$, muy significativos («**») para $0.001 < P < 0.01$ y extremadamente significativos («***») para $P < 0.001$. Para la rama de retraso de crecimiento tumoral del estudio, se presentó el porcentaje de animales en cada grupo que permanecieron en el estudio en función del tiempo en una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier.

Extracción de histonas

Para el aislamiento de las histonas, se homogeneizaron 60-90 mg de tejido tumoral en 1.5 mL de tampón de extracción nuclear (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 25 mM, Triton X-100 al 1%, sacarosa al 8.6%, más un comprimido inhibidor de proteasas de Roche 1836145) y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Los núcleos se recogieron mediante centrifugación a 600 g durante 5 minutos a 4 °C y se lavaron una vez con PBS. Se retiró el sobrenadante y las histonas se extrajeron durante una hora, agitando con vórtex cada 15 minutos, con ácido sulfúrico frío 0.4 N. Los extractos se clarificaron mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga nuevo que contenía 10x volumen de acetona enfriada con hielo. Se hicieron precipitar las histonas a -20 °C durante 2 horas-toda la noche, se sedimentaron mediante centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos y se suspendieron de nuevo en agua.

ELISA

Las histonas se prepararon en concentraciones equivalentes en tampón de recubrimiento (PBS + 0.05% de BSA) lo que produjo 0.5 ng/μL de muestra, y se añadieron 100 μL de muestra o patrón por duplicado a 2 placas para ELISA de 96 pocillos (Thermo Labsystems, Immulon 4HBX n.º 3885). Las placas se sellaron y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3x con 300 μL/pocillo de PBST (PBS + 0.05% de Tween 20; 10X PBST, KPL n.º 51-14-02) en un lavador de placas Bio Tek. Las placas se bloquearon con 300 μL/pocillo de diluyente (PBS + 2% de BSA + 0.05% de Tween 20), se incubaron a TA durante 2 horas y se lavaron 3x con PBST. Todos los anticuerpos se diluyeron en diluyente. Se añadieron 100 μL/pocillo de anticuerpo anti-H3K27me3 (CST n.º 9733, disolución madre en glicerol al 50% 1:1000) o anti-H3 total (Abcam ab1791, al 50% en glicerol 1:10 000) a cada placa. Las placas se incubaron durante 90 min a TA y se lavaron 3x con PBST. Se añadieron 100 μL/pocillo de anticuerpo anti-Rb-IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 7074) 1:2000 a la placa de H3K27Me3 y 1:6000 a la placa de H3 y se incubaron durante 90 min a TA. Las placas se lavaron 4x con PBST. Para la detección, se añadieron 100 μL/pocillo de sustrato de TMB (BioF_x Laboratories, n.º TMBS) y se incubaron las placas en la oscuridad a TA durante 5 min. La reacción se detuvo con 100 μL/pocillo de H₂SO₄ 1 N. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas SpectraMax M5.

Resultados:

5 Los ratones portadores de los xenoinjertos tumorales SUDHL10 se trataron con el bromhidrato del Compuesto I con la dosis máxima tolerada de 500 mg/kg BID y fracciones de la MTD ($\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de MTD). Todas las dosis fueron bien toleradas durante 28 días sin ninguna pérdida significativa de peso corporal. Se produjo un fallecimiento no relacionado con el tratamiento en el grupo de 500 mg/kg el día 15 debido a un error de dosificación. Todas las dosis dieron como resultado una inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el vehículo el día 28 (Tabla 4) y los grupos de 250 mg/kg y 500 mg/kg BID indujeron regresiones (TGI > 100%).

10

Tabla 4:

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

15 La Figura 12A muestra el crecimiento de los tumores de xenoinjerto de SUDHL10 en función del tiempo para los diferentes grupos de tratamiento. El grupo de 125 mg/kg BID no fue significativamente diferente del grupo de vehículo según la ANOVA de mediciones repetidas y la posprueba de Dunnett, pero el tamaño medio del tumor terminal el día 28 fue significativamente más pequeño que el del grupo de vehículo (ANOVA de dos vías con posprueba de Bonferroni, $p < 0.0001$). La dosificación de 250 mg/kg BID y 500 mg/kg BID del bromhidrato del Compuesto I durante 28 días indujo respuestas de regresión comparables, ya que los pesos de los tumores terminales el día 28 fueron similares para esos 2 grupos (Figura 12B).

20

25 Las histonas aisladas de los tumores recolectados el día 28 (3 h después de la última dosis) se sometieron a un análisis de ELISA para determinar los niveles globales de H3K27me3. La Figura 13 muestra una reducción clara dependiente de la dosis de la marca del metilo de H3K27me3 con el tratamiento con el bromhidrato del Compuesto I. Esta figura muestra una metilación global de H3K27me3 en tumores de SUDHL10 en ratones tratados con el bromhidrato del Compuesto I durante 28 días.

30

30 El día 25 se seleccionaron ocho ratones por grupo con los tumores más pequeños para realizar un estudio del retraso del crecimiento tumoral con el fin de evaluar el crecimiento de nuevo de tumores después de finalizar la dosificación el día 28. Los ratones se sacrificaron cuando sus tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm³ o el día 60 (lo que sucediera primero). Estos datos se utilizaron para llevar a cabo un análisis de supervivencia de Kaplan Meier. La Figura 14A muestra que el crecimiento de nuevo del tumor depende claramente de la dosis y todos los ratones tratados con la dosis más elevada de 500 mg/kg BID durante 28 días sobrevivieron hasta el día 60. Únicamente 2 ratones tuvieron que ser sacrificados en el grupo de 250 mg/kg antes del día 60. Los ratones en el grupo de 125 mg/kg presentaron un beneficio claro de supervivencia en comparación con los ratones tratados con vehículo, con un incremento en la supervivencia mediana de 15.5 días (Figura 14B).

35

40 Efecto contra el cáncer del bromhidrato del Compuesto I en el modelo de xenoinjerto en ratón de linfoma humano difuso de linfocitos B grandes de Pfeiffer

45

Se evaluó el monobromhidrato del Compuesto I para determinar su actividad contra el cáncer en un modelo de xenoinjerto en ratón de Pfeiffer, el cual es un modelo de xenoinjerto de linfoma humano difuso de linfocitos B grandes. Se implantaron de 20 a 25 mg de fragmentos tumorales por vía subcutánea en ratones NSG hembra de 5 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine). El tratamiento se inició aproximadamente 31 días después del implante del tumor, cuando los tumores promedio alcanzaron aproximadamente 365 mm³. El programa del tratamiento se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de dosificación

Grupo	N.º de animales	Tratamiento	Vía y programa
A	9	Vehículo (0.5% de metilcelulosa, 0.1% de Tween-80)	PO; qdx28
B	9	34.2 mg/kg de Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx28
C	9	114 mg/kg de Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx28

Grupo	N.º de animales	Tratamiento	Vía y programa
D	9	342 mg/kg de Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx28
E	9	1140 mg/kg de Compuesto I (sal de HBr)	PO; qdx12 [§]

§ Debido a un problema de tolerabilidad del compuesto, se suministraron únicamente 12 dosis diarias a este grupo.

Se siguió el volumen tumoral a lo largo del experimento. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana después del inicio del tratamiento. Se calculó la carga tumoral ($\text{mg} = \text{mm}^3$) a partir de mediciones con calibre utilizando la fórmula para el volumen de un elipsoide prolata $(L \times W^2)/2$, donde L y W son las mediciones perpendiculares respectivas de longitud y anchura (mm).

El Día 1 fue el día del primer tratamiento y el Día 28 fue el día del último tratamiento. Este estudio finalizó 36 días después de la última dosis, de modo que el Día 64 fue el día de la terminación del estudio. Los criterios de valoración primarios utilizados para evaluar la eficacia en este estudio fueron las regresiones completas del tumor (CR), tamaños del tumor entre los grupos y porcentaje de inhibición del tumor al final del estudio. Se definió una respuesta completa como una reducción en el tamaño del tumor hasta un tamaño no detectable ($< 20\text{mm}^3$) al final del estudio. Los valores para el porcentaje de inhibición del tumor se calcularon a partir de la fórmula $[1 - (\Delta T / \Delta C)] \times 100$, donde ΔT y ΔC son cambios en el volumen tumoral medio (Δ crecimiento) para cada grupo tratado (T) y de control de vehículo (C). T_0 y C_0 (un día antes de la primera dosis) se utilizaron para el volumen tumoral de partida. Además, los volúmenes tumorales que se registraron un día después de la última dosis (T_{29} y C_{29}) se utilizaron para el cálculo de ΔT y ΔC . Cuando el valor fue superior a un 100%, se concluyó que era un 100%. La fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de inhibición del tumor se muestra a continuación.

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

Durante el periodo de tratamiento, se observó que los animales no pueden tolerar un tratamiento diario de 1142 mg/kg de bromhidrato del Compuesto I y tres animales en este grupo (grupo E) requirieron ser sacrificados después de la primera semana de tratamiento debido a una pérdida de más de un 20% del peso corporal de referencia. Por lo tanto, la administración del fármaco para este grupo se detuvo después de 12 dosis. Los animales en los otros tres grupos de dosificación, excepto un animal en el grupo D (342 mg/kg de bromhidrato del Compuesto I), toleraron bien todos ellos el tratamiento de 28 días con una pérdida mínima de peso corporal. En la Figura 15, el peso corporal relativo de los ratones se representó en una gráfica. El peso corporal de los animales obtenido el Día 0 se utilizó como el peso corporal de referencia en la gráfica.

El bromhidrato del Compuesto I presentó una actividad contra el cáncer potente y de acción prolongada en el modelo de Pfeiffer, con una tasa de CR de un 100% en tres de los cuatro grupos de dosificación (Tabla 6). Además, no se observó un crecimiento de nuevo del tumor incluso 36 días después del cese del tratamiento. Esto sugiere que todas las células tumorales fueron eliminadas durante el tratamiento. Aunque se observó un crecimiento de nuevo del tumor en el grupo con la dosis más baja (grupo B, 34.2 mg/kg), se observó una clara actividad de estasis del tumor durante el periodo de tratamiento (Figura 16). El tumor únicamente empezó a crecer al cesar el tratamiento (Figura 16). Este resultado también sugiere que la actividad de estasis del tumor observada en el grupo B es, en efecto, una actividad inducida por el artículo de prueba.

Tabla 6. Tabla de resumen de los resultados

Grupo	Tratamiento	CR	TV (media \pm desv.est.)	Porcentaje de inhibición del tumor	Valor de P [€]
A	Vehículo	0	2882 \pm 2190	n/a	n/a
B	34.2 mg/kg de Comp I (HBr)	0	497 \pm 287	93%	P < 0.05
c	114 mg/kg de Comp I (HBr)	9	0	100%	P < 0.05
D	342 mg/kg de Comp I (HBr)	8 [£]	0	100%	P < 0.05
E	1140 mg/kg de Comp I (HBr)	6 [¥]	0	100%	P < 0.05

Grupo	Tratamiento	CR	TV (media \pm desv.est.)	Porcentaje de inhibición del tumor	Valor de P [€]
<p>€ Análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett (software Prism versión 5.02, Lake Forest, CA).</p> <p>£ 1 animal fue sacrificado el día 36 debido a un peso corporal bajo.</p> <p>¥ 3 animales fueron sacrificados el día 7, 9 y 11, de forma individual debido a un peso corporal bajo.</p>					

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular del sistema hematológico.
- 2.** Un compuesto para su uso según se reivindica en la reivindicación 1, el cual es un monobromhidrato.
- 10 **3.** Un compuesto para su uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicho compuesto es cristalino.
- 4.** Un compuesto para su uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho compuesto está exento de impurezas.
- 15 **5.** Un compuesto para su uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho compuesto es un sólido cristalino sustancialmente exento de bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida amorfo.
- 20 **6.** El Polimorfo A del bromhidrato de *N*-((4,6-dimetil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)amino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carboxamida para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular del sistema hematológico; donde el Polimorfo A exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados y 22.0 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 25 **7.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados y 22.0 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 30 **8.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene uno o más picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y aproximadamente 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 35 **9.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 5 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 40 **10.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 6 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 45 **11.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 7 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 50 **12.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 8 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 55 **13.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 9 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 60 **14.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos 10 picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.
- 65 **15.** El polimorfo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7; donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta en 3.9 +/- 0.3 grados, 10.1 +/- 0.3 grados, 14.3 +/- 0.3 grados, 17.5 +/- 0.3 grados, 18.7 +/- 0.3 grados, 20.6 +/- 0.3 grados, 20.9 +/- 0.3 grados, 21.8 +/- 0.3 grados, 22.0 +/- 0.3 grados, 23.3 +/- 0.3 grados y 23.6 +/- 0.3 grados 2-theta.

16. Un polimorfo para su uso según se reivindica en la reivindicación cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, donde el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Figura 1 y/o el polimorfo exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente de acuerdo con la Tabla 1:

5

Tabla 1

Picos (grados 2-theta)
3.9
10.1
14.3
17.5
18.7
20.6
20.9
21.8
22.0
23.3
23.6

10 17. Un polimorfo para su uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, donde el polimorfo exhibe un termograma de calorimetría diferencial de barrido que tiene un pico característico expresado en unidades de °C a una temperatura de 255 +/- 5 °C.

15 18. Un polimorfo para su uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, donde el polimorfo exhibe un termograma de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con la Figura 3.

19. Un polimorfo para su uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el trastorno proliferativo celular del sistema hematológico es un cáncer hematológico.

20 20. Un polimorfo para su uso según se reivindica en la reivindicación 19, donde el cáncer hematológico se selecciona entre mieloma múltiple, linfoma, leucemia, neoplasias mieloides y neoplasias de mastocitos.

25 21. Un polimorfo para su uso según se reivindica en la reivindicación 20, donde el linfoma se selecciona entre linfoma de Hodgkin, linfomas infantiles y linfomas de origen cutáneo y linfocítico.

22. Un polimorfo para su uso según se reivindica en la reivindicación 20, donde la leucemia se selecciona entre leucemia infantil, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de mastocitos.

30 23. Un polimorfo para su uso según se reivindica en la reivindicación 20, donde el cáncer hematológico es mieloma múltiple.

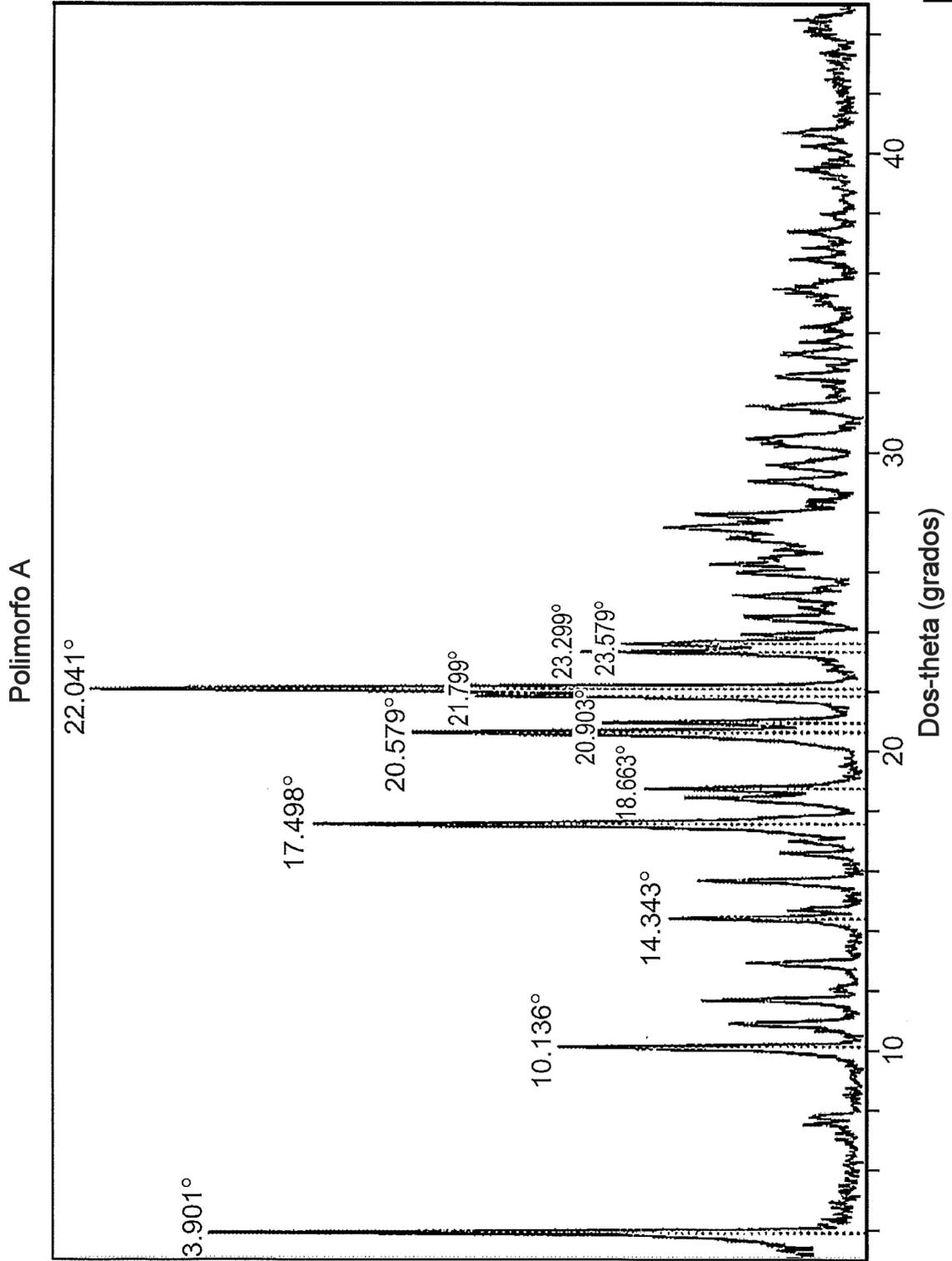


FIG. 1

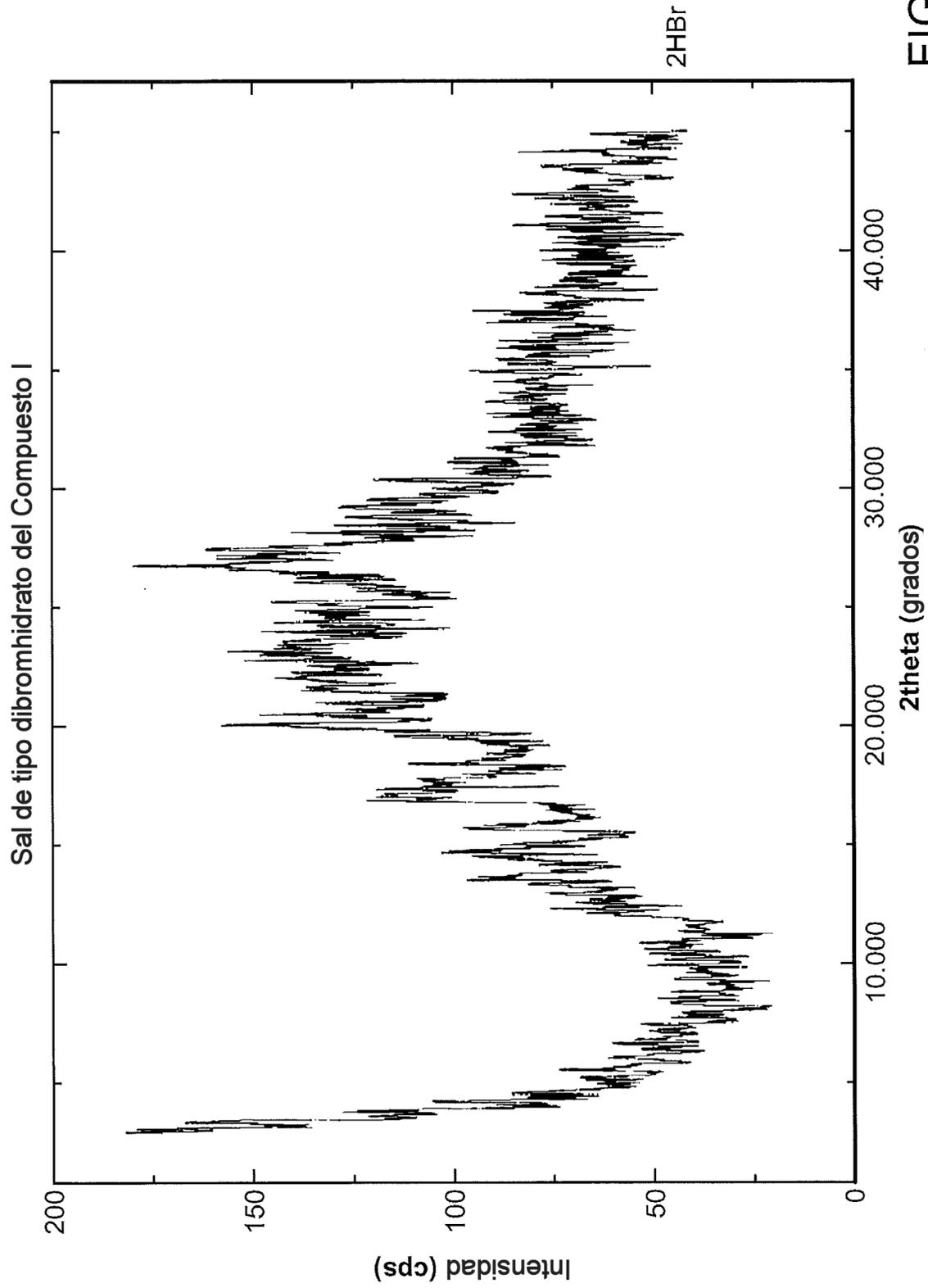


FIG. 2

Polimorfo A

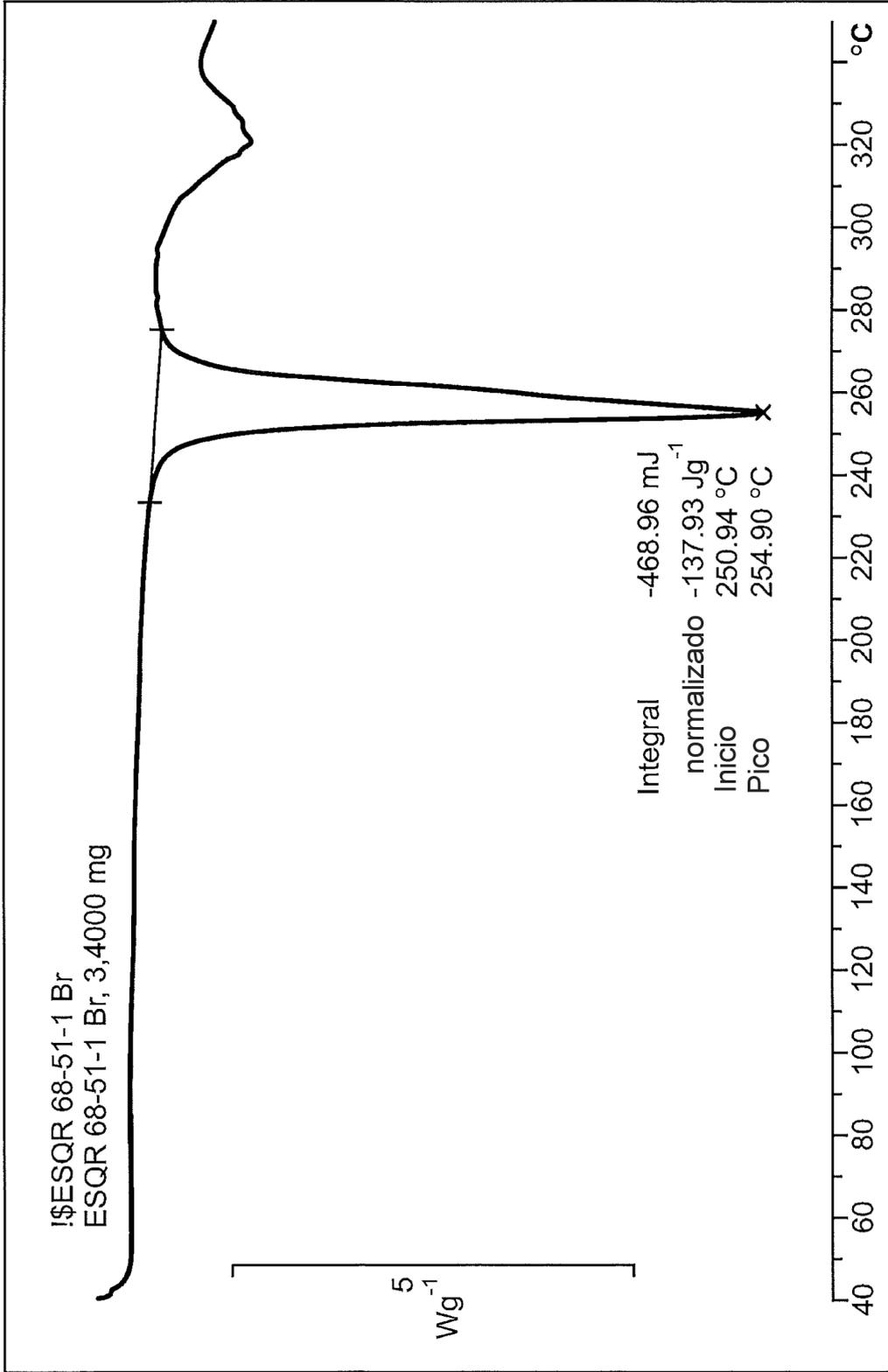


FIG. 3

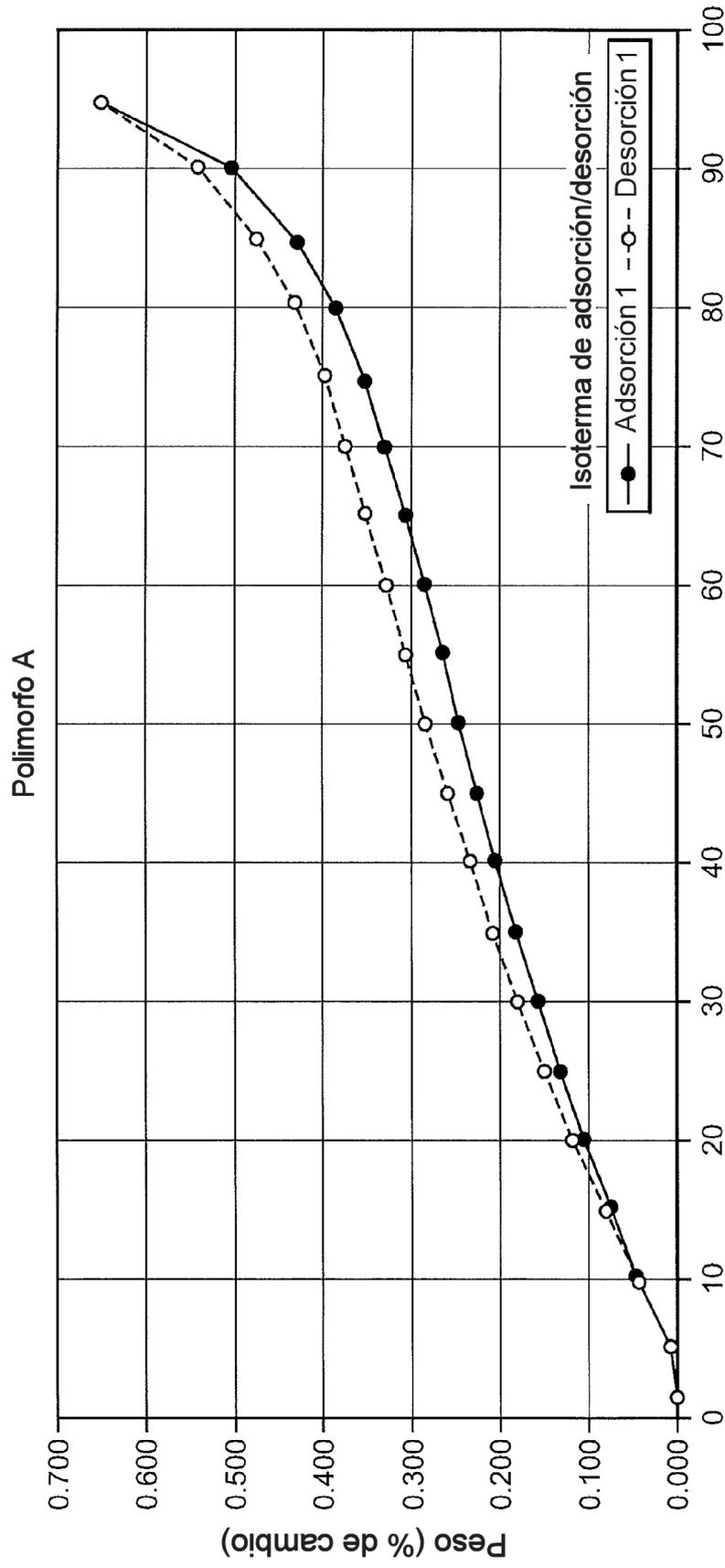


FIG. 4

Tiempo	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 días
Base libre, % p	100.0	98.6	97.5	94.0
HBr, % p	100.0	99.1	97.7	98.3

Tiempo	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 días
Base libre, % p	98.3	97.9	97.9	97.3
HBr, % de área	98.8	98.6	98.5	98.5

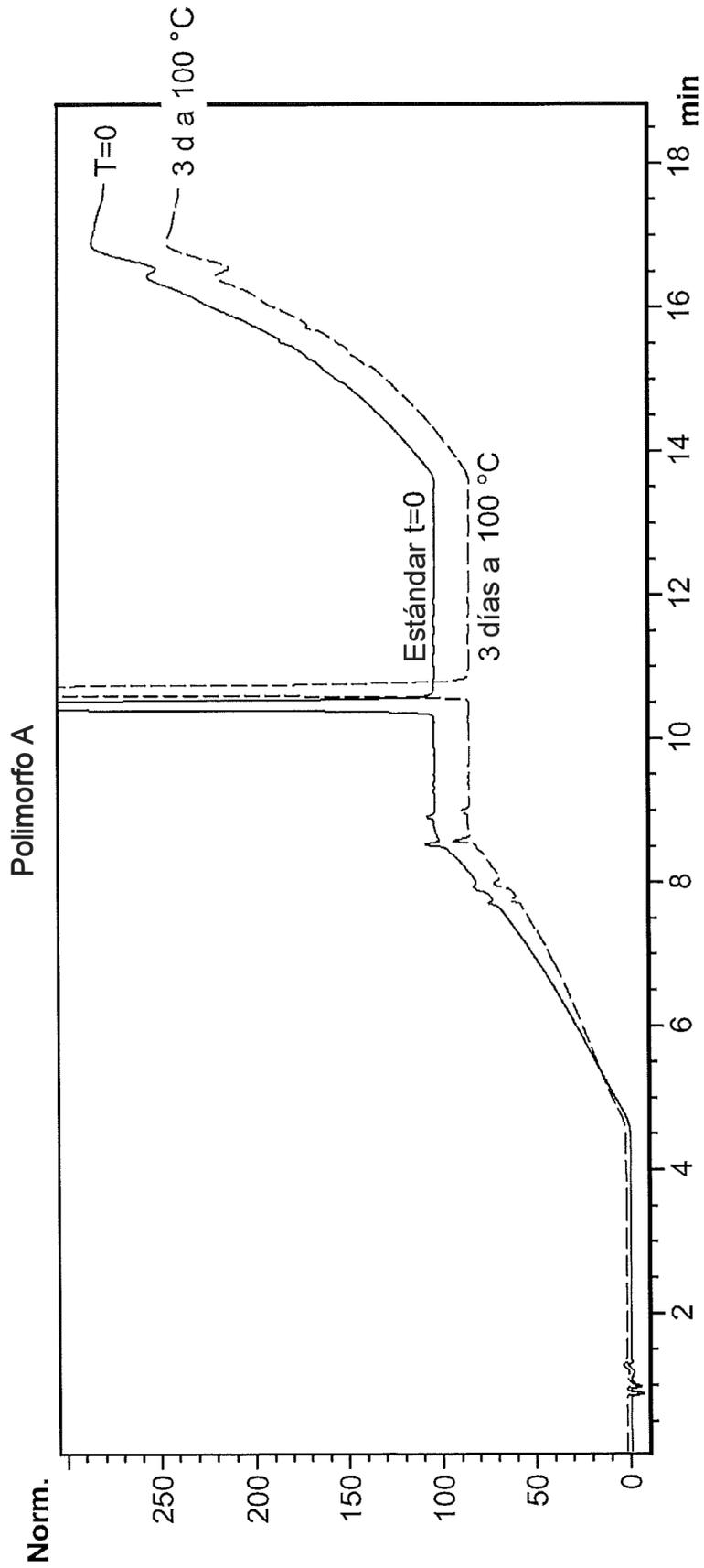


FIG. 5

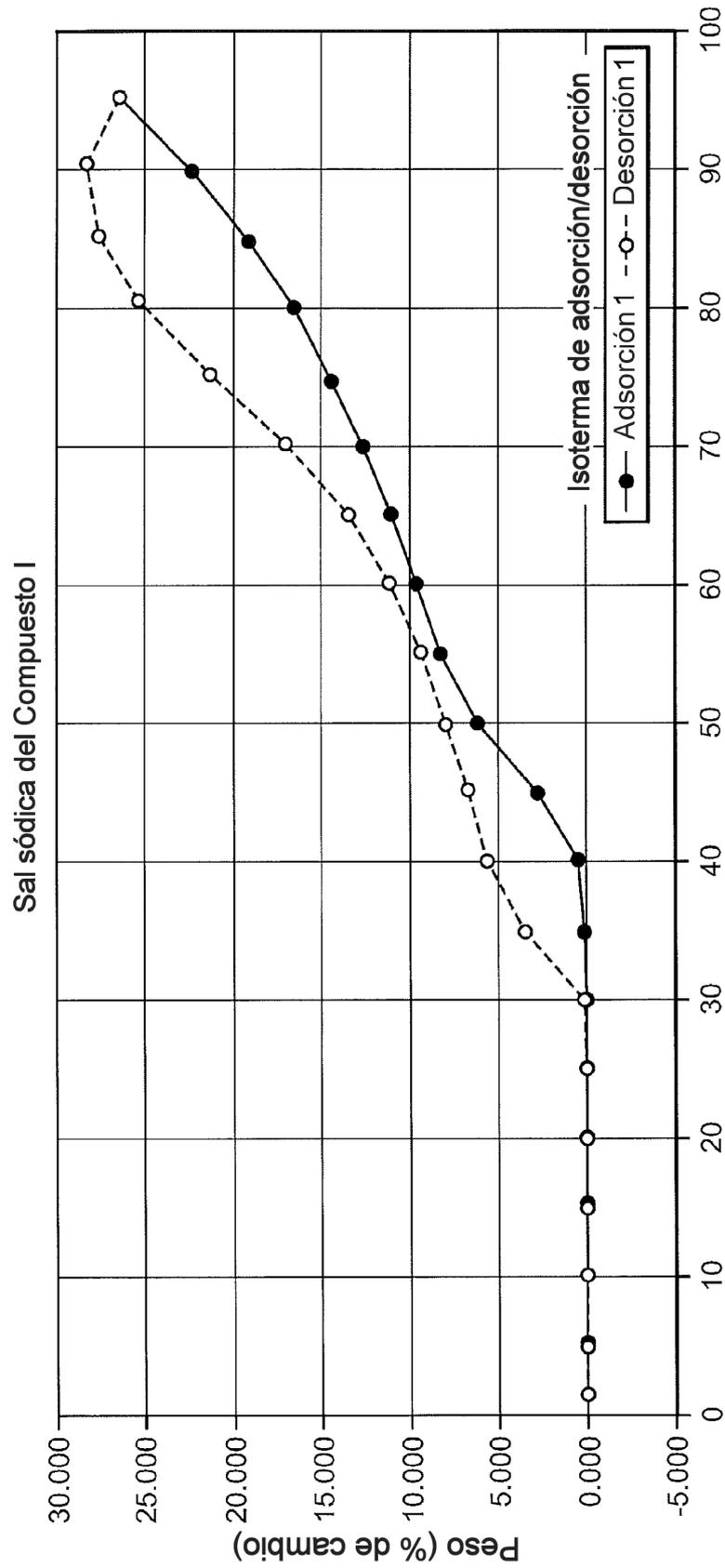


FIG. 6

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

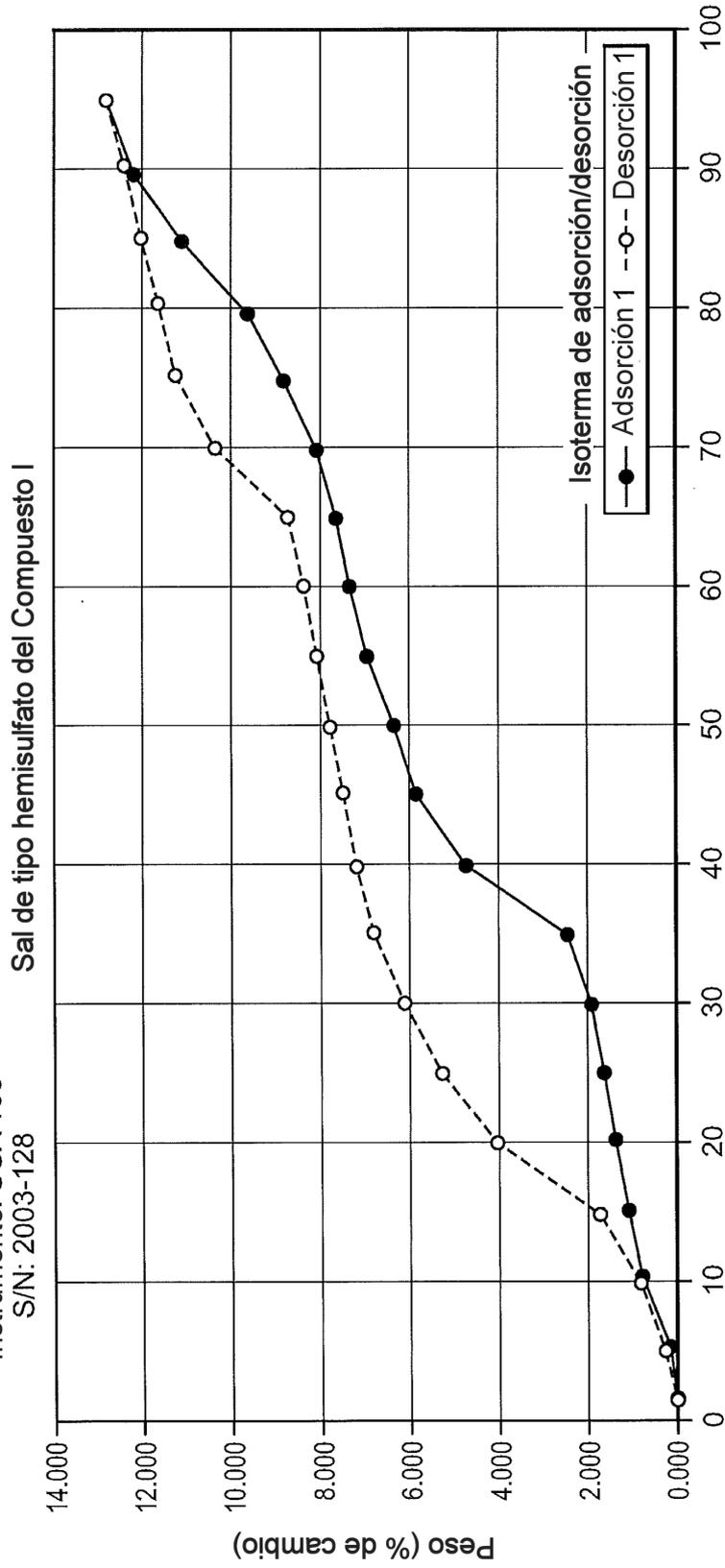


FIG. 7

Sal de HCl del Compuesto I

!\$ESQR-HCl partículas más finas de la sal, 2.4000 mg
ESQR-HCl partículas más finas de la sal, 2.4000 mg

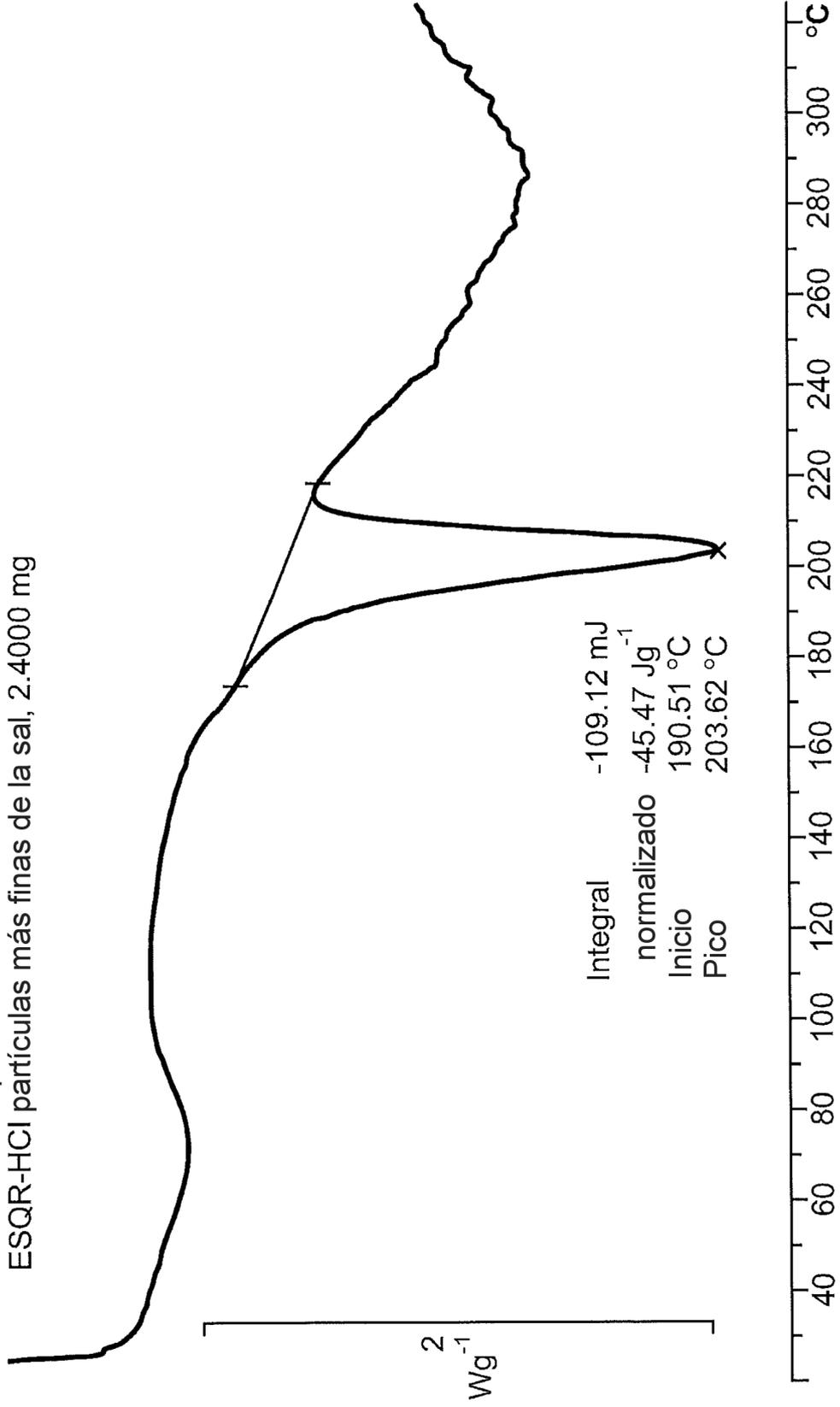


FIG. 8

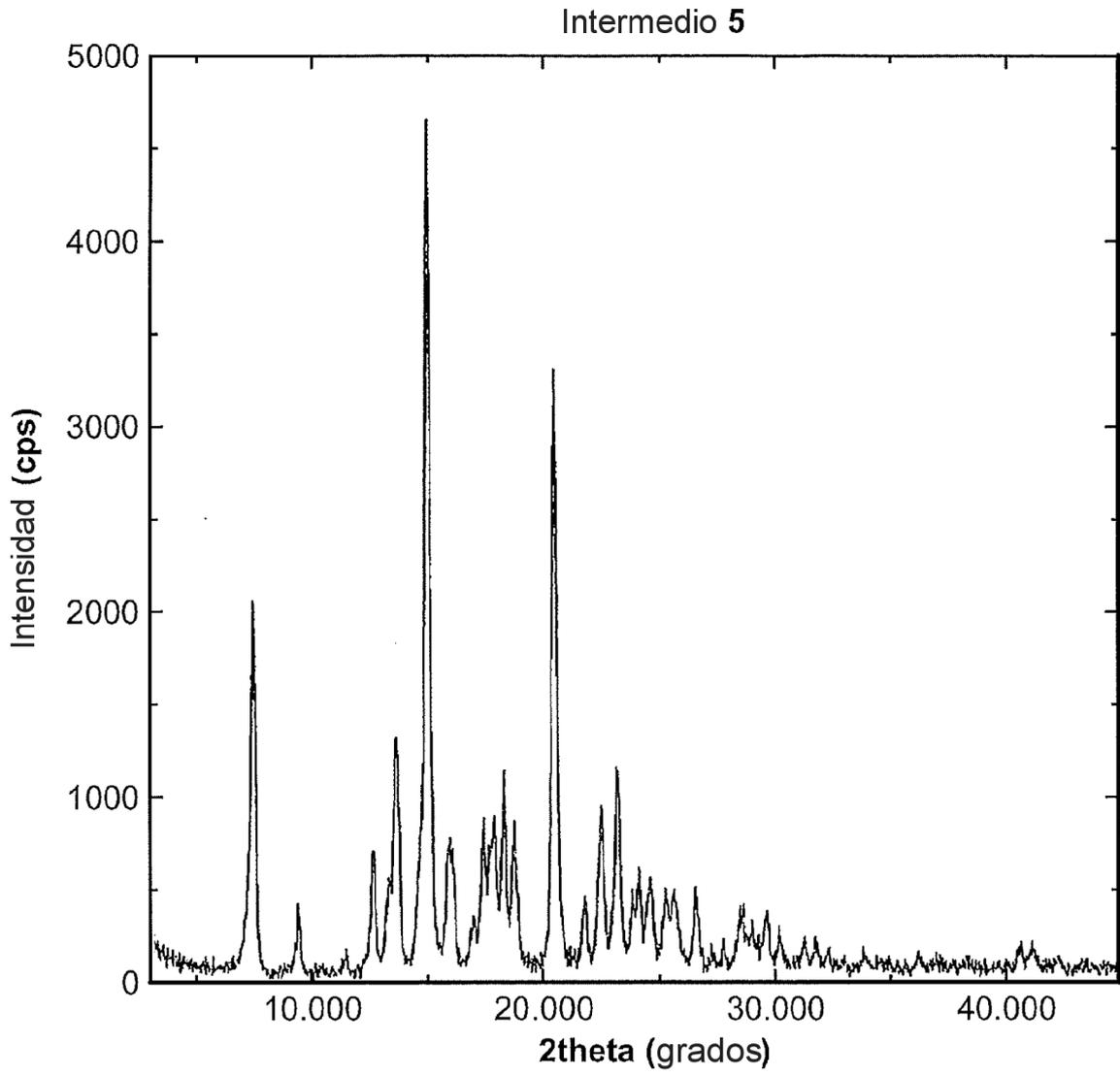


FIG. 9

Polimorfo B

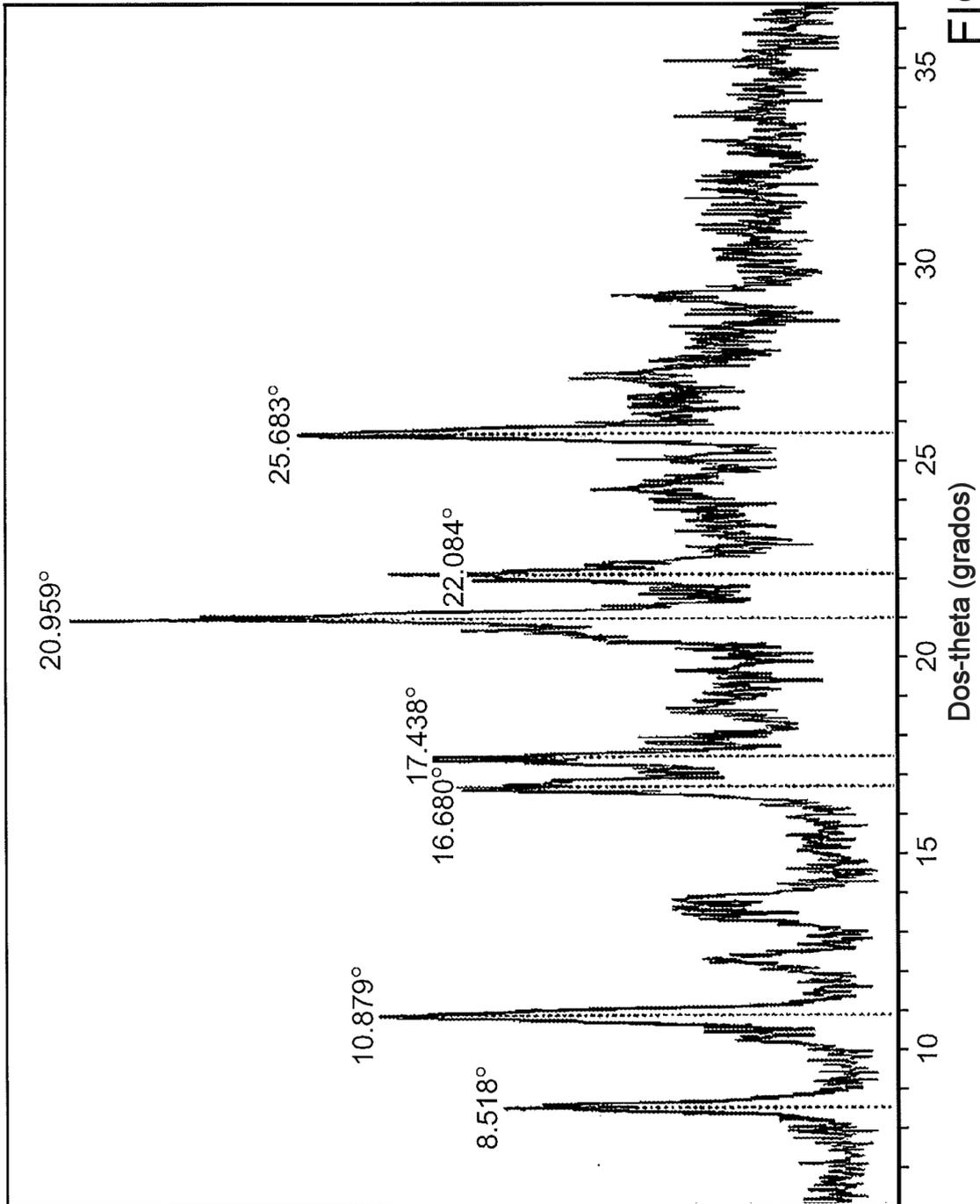


FIG. 10

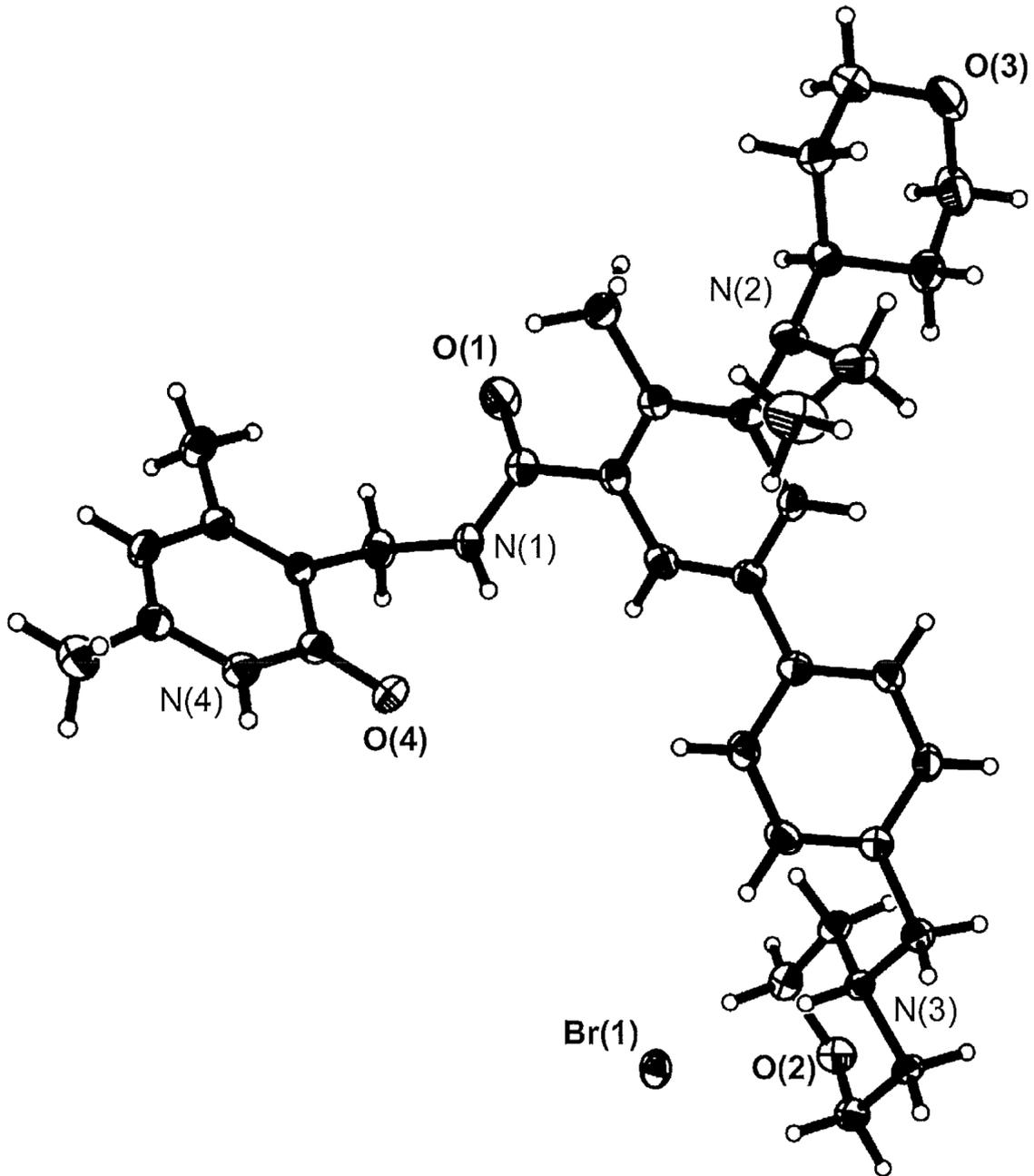


FIG. 11

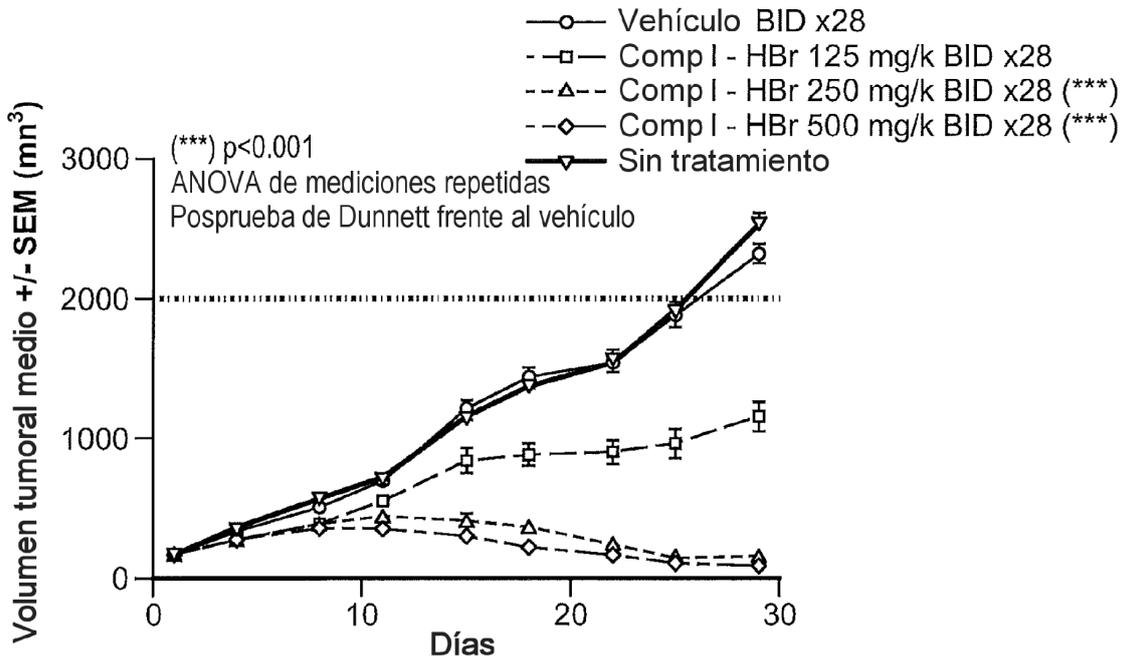


FIG. 12A

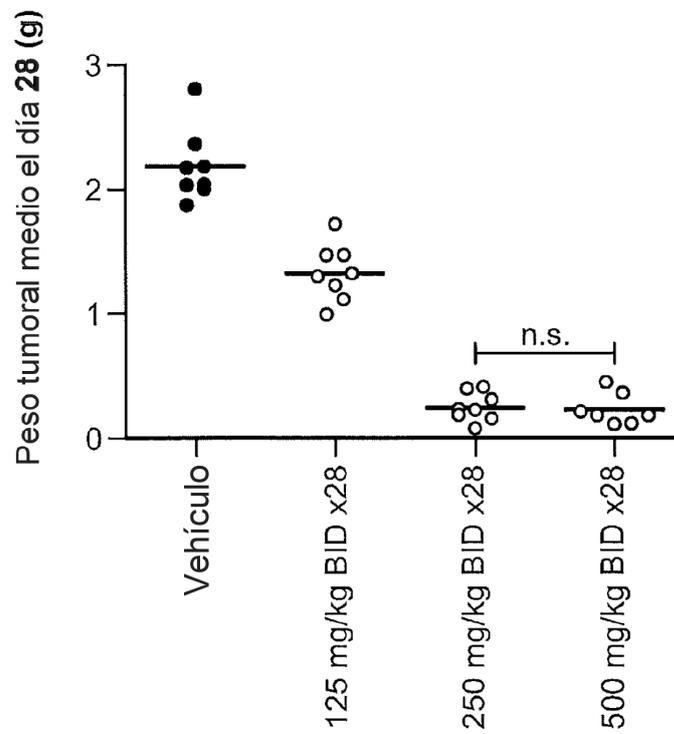


FIG. 12B

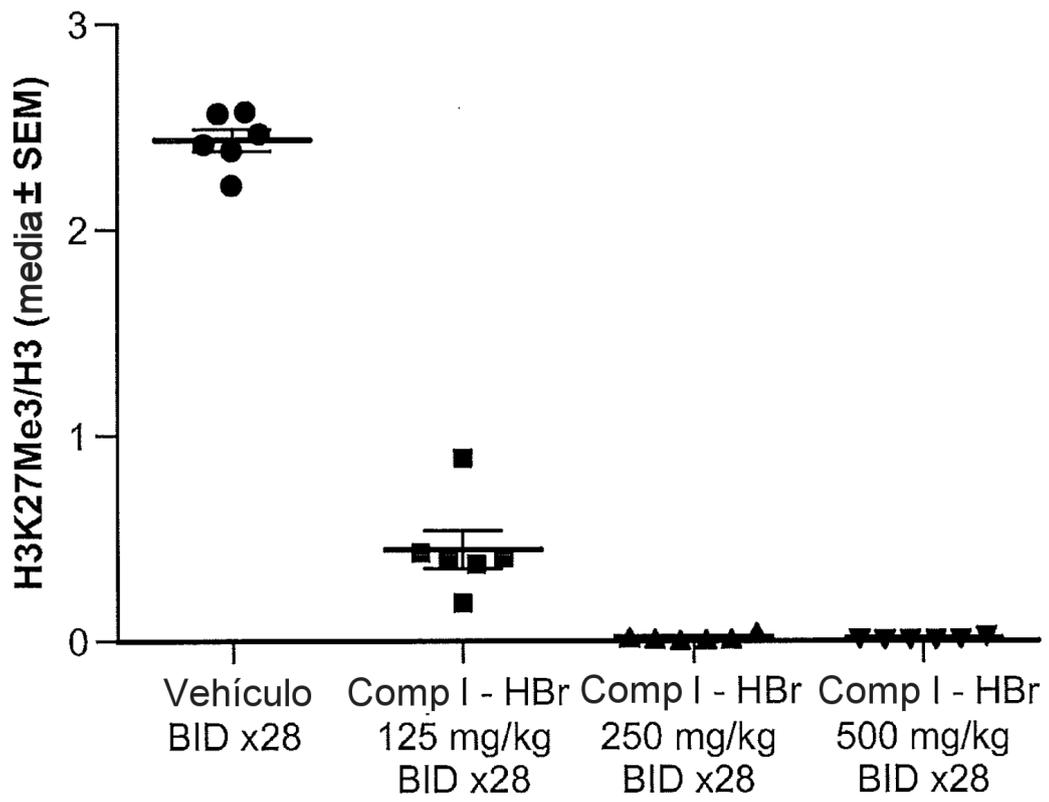


FIG. 13

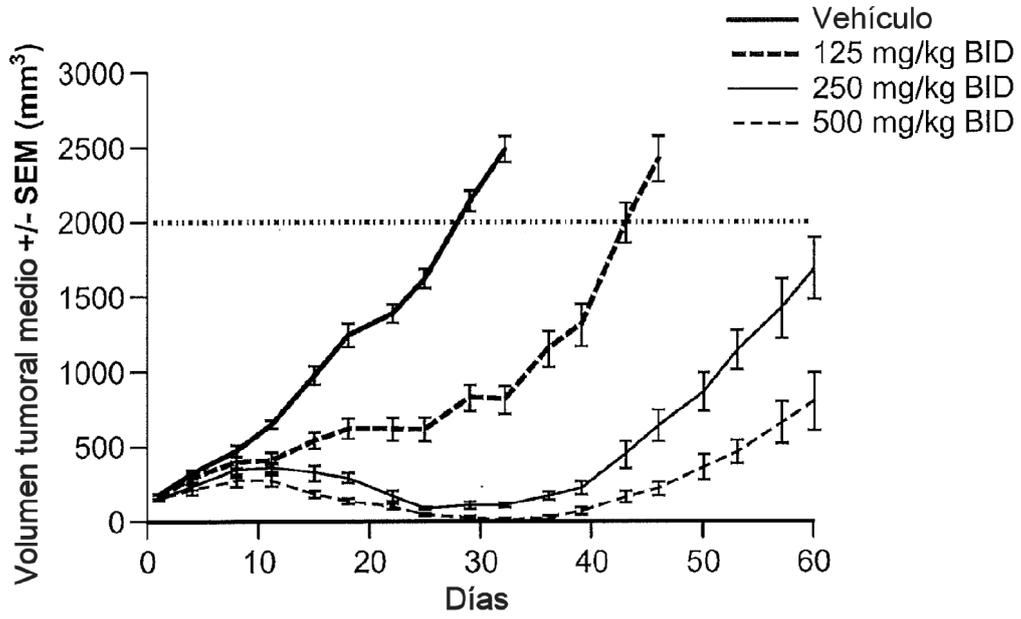


FIG. 14A

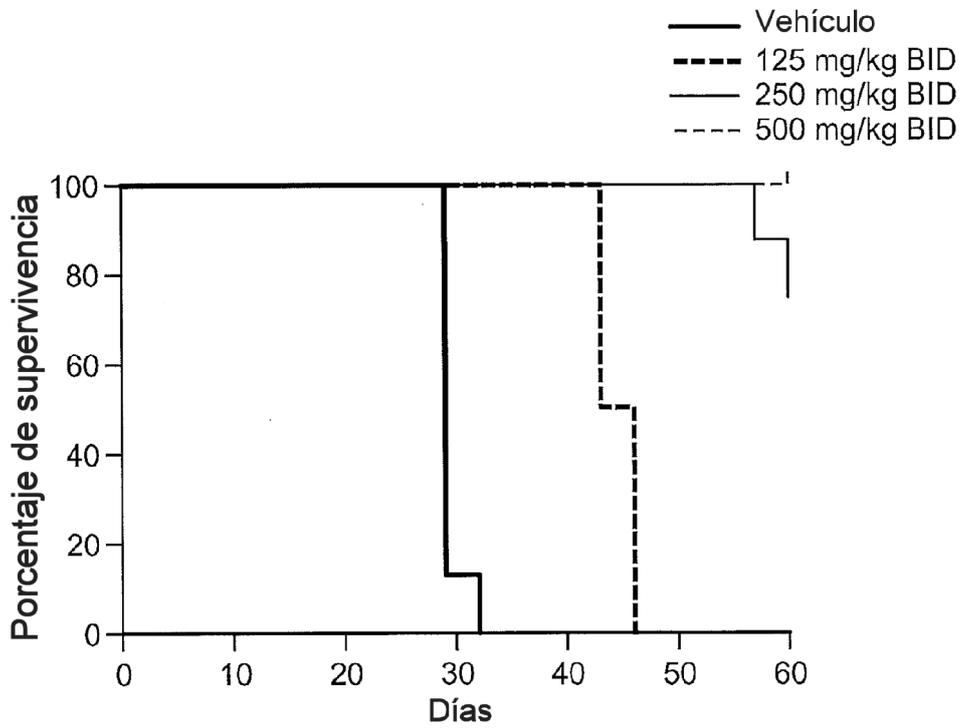


FIG. 14B

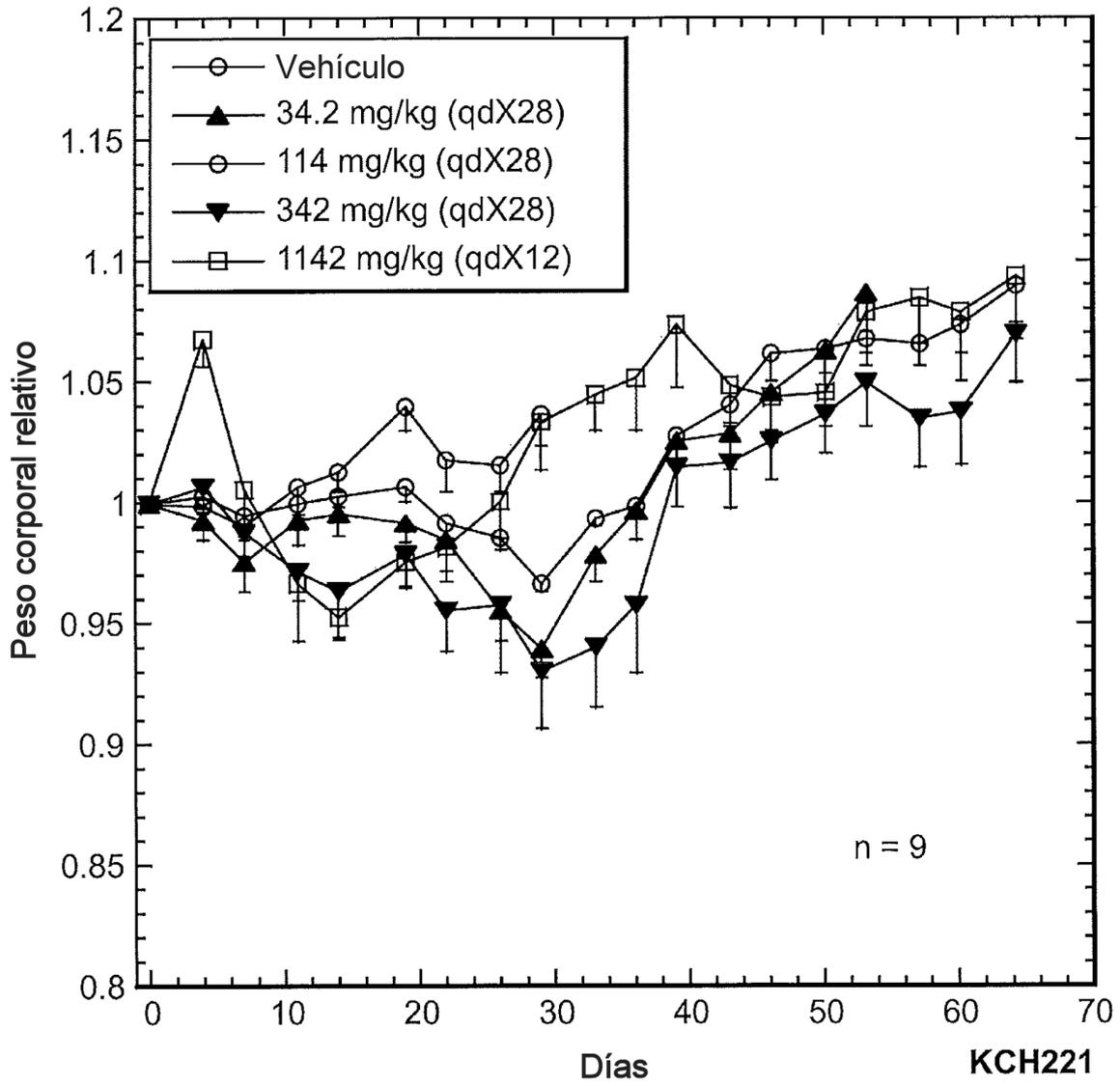


FIG. 15

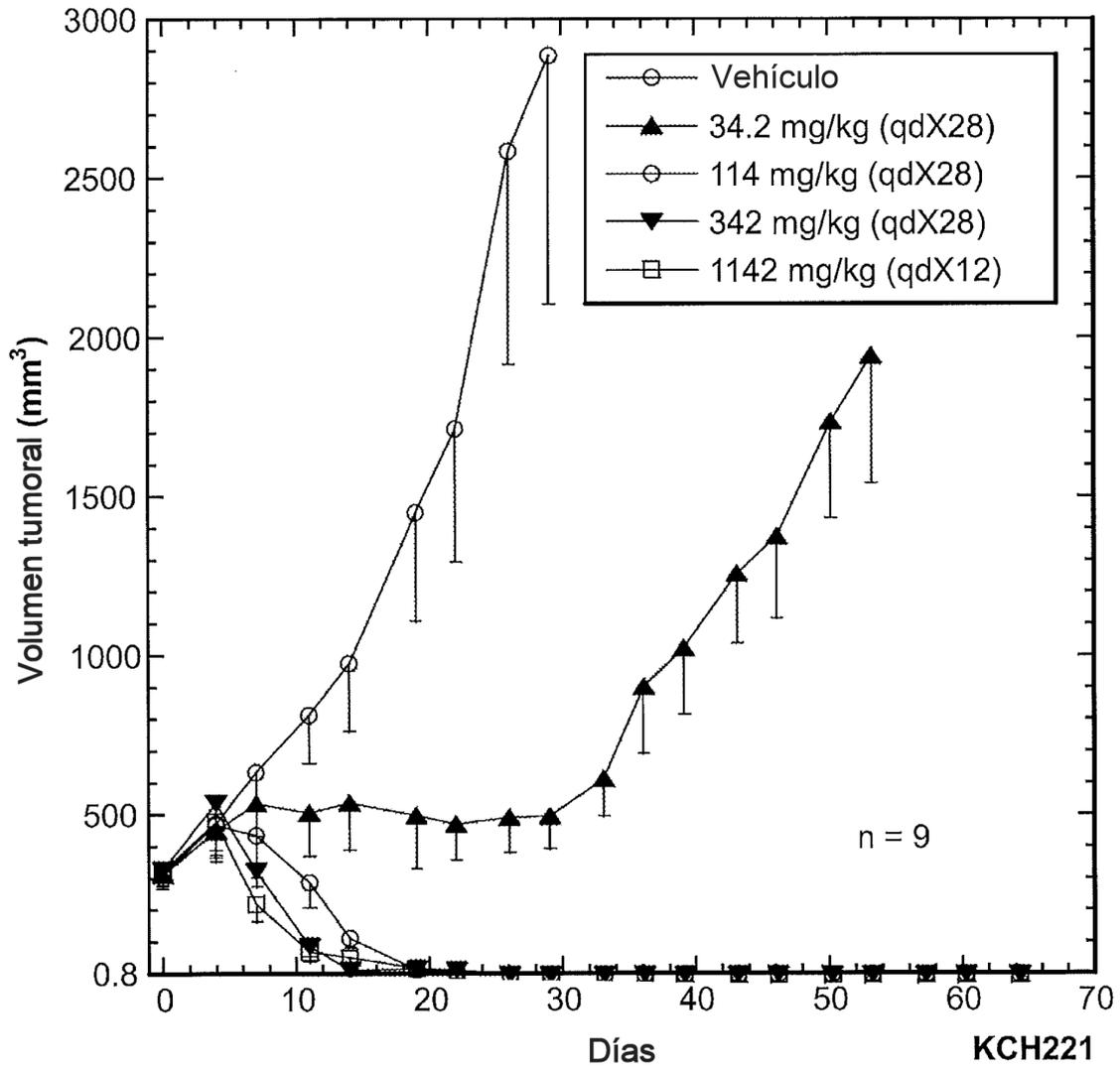


FIG. 16

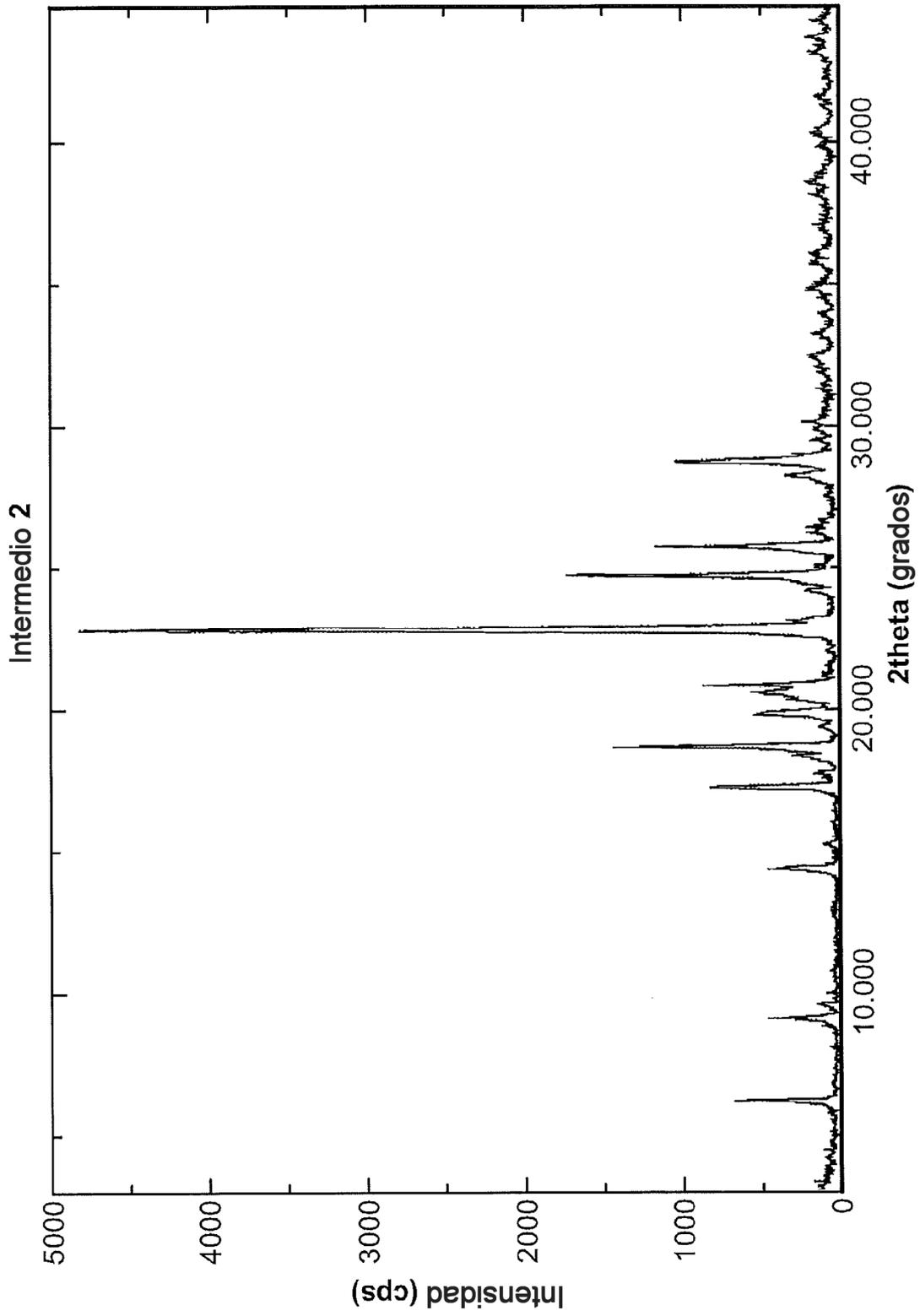


FIG. 17

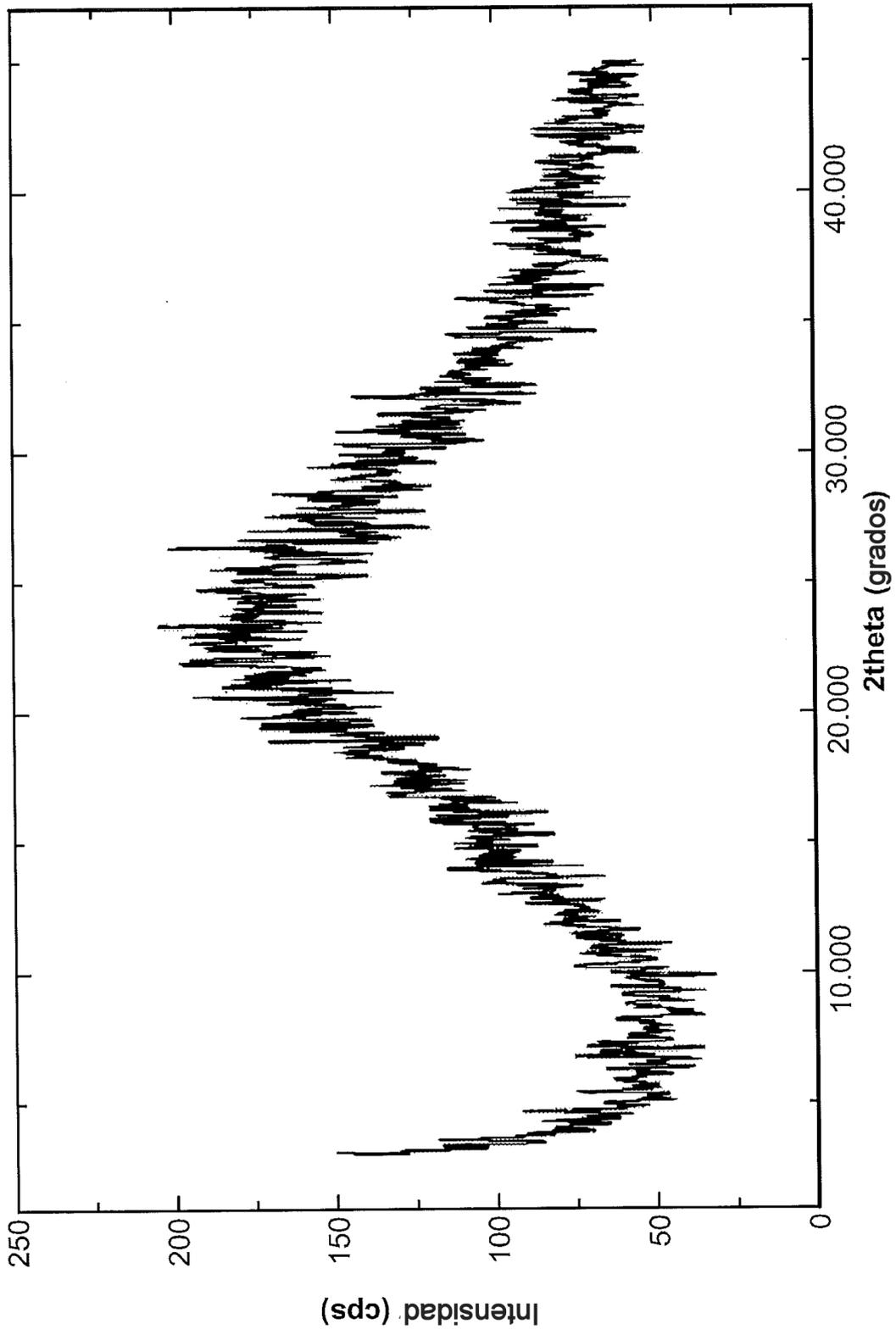


FIG. 18A

HR de la muestra (%)
Inicio de la recolección de datos: 08-04-2011, 10:53 AM
Nombre de la muestra: ESQR sal de tipo HCl
Lote de la muestra: "
Nombre del archivo: iso-08-04-2011-10-49-30.ls~
Operador: vti
Instrumento: SGA 100
S/N: 2003-128

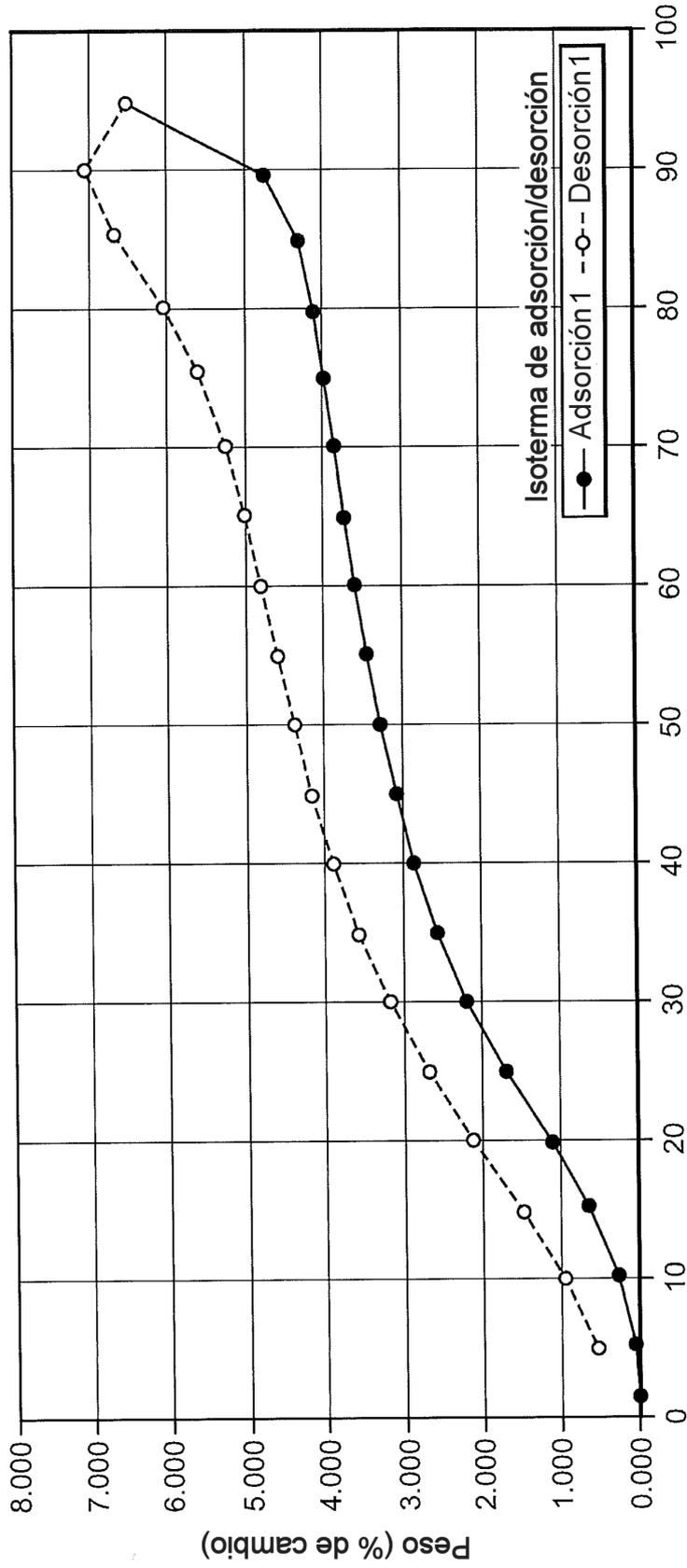


FIG. 18B