

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 492**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
C07D 491/16 (2006.01)
C07D 491/12 (2006.01)
C07D 491/18 (2006.01)
C07D 498/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2016** **E 20181616 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 3733187**

54 Título: **Macro ciclo de diarilo quirál y uso del mismo en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

21.07.2015 US 201562195081 P
02.03.2016 US 201662302231 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.01.2025

73 Titular/es:

TURNING POINT THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

CUI, JINGRONG JEAN;
LI, YISHAN;
ROGERS, EVAN W.;
ZHAI, DAYONG;
DENG, WEI y
HUANG, ZHONGDONG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 993 492 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

Macrociclo de diarilo quiral y uso del mismo en el tratamiento del cáncer

5 **Campo técnico**

Esta divulgación se relaciona con el uso de ciertos compuestos macrocíclicos de diarilo, específicamente (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5H)-ona para su uso en el tratamiento del cáncer en mamíferos, especialmente en humanos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas cinasas son reguladoras clave para el crecimiento, proliferación y sobrevivencia celular. Las alteraciones genéticas y epigenéticas se acumulan en las células cancerígenas que llevan a una activación anormal de las vías de transducción de señal que llevan a procesos malignos. (Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912–1934). La inhibición farmacológica de estas vías de señalización presenta oportunidades de intervención prometedoras para terapias dirigidas contra el cáncer. (Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* **2004**, 432, 294–297).

La cinasa de linfoma anaplásico (CLA), junto con tirosina cinasa leucocitaria (LTK por sus siglas en inglés), pertenece a la súper familia de receptores de insulina (RI) de las tirosinas cinasas receptoras. CLA es principalmente expresado en los sistemas nerviosos central y periférico que sugieren un potencial papel en el desarrollo y función normal del sistema nervioso. (Pulford K, et al *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 2939). CLA primero se descubrió como una proteína de fusión, NPM (nucleofosmina)-CLA codificado por un gen de fusión generado de la translocación cromosómica t(2;5)(p23;q35) en líneas celulares de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) en 1994. (Morris SW, et al *Science* **1994**, 263, 1281.) Más de veinte distintos socios de translocación de CLA se han descubierto en muchos cánceres, incluyendo ALCL (60-90 % de incidencia), tumores miofibroblásticos inflamatorios (TMI, 50-60 %), carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC, 3-7 %), cánceres colorrectales (CCR, 0-2,4 %), cáncer de mama (0-2,4 %) y otros carcinomas con incidencia rara. (Grande E, et al *Mol. Cancer Ther.* **2011**, 10, 569.) Se han descubierto mutaciones puntuales oncogénicas de CLA tanto en casos esporádicos como familiares de neuroblastoma. (Mossé YP, et al *Nature* **2008**, 455, 930–935.) Las CLAs tanto de fusión como mutantes son altamente oncogénicas, que generan un gran interés y esfuerzos en el desarrollo de inhibidores de CLA para el tratamiento de tumores sólidos, mesenquimales y hematopoyéticos con un gen CLA anormal. (Grande, E, et al *Mol. Cancer Ther.* **2011**, 10, 569-579.). El crizotinib fue aprobado por la Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de cáncer pulmonar de células no pequeñas CLA-positivo. Similar con muchas terapias dirigidas de inhibidores de la cinasa, la resistencia al fármaco crizotinib se desarrolló en aproximadamente 10 meses. Los mecanismos de resistencia al fármaco incluyen amplificación o sobreexpresión de gen objetivo, desarrollo de mutaciones sin sentido secundarias y el uso de la vía alternativa de señalización (llamada "resistencia de derivación"). Como resultado, se han desarrollado los inhibidores de CLA de segunda generación para ser más potentes contra las muchas CLAs mutantes y silvestres. Una dicha mutación es la mutación del guardián ALK^{L1196M}. El ceritinib fue aprobado por la Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas CLA-positivo que muestran una progresión de la enfermedad o los que son intolerantes al crizotinib. Aunque muchos inhibidores de CLA de segunda generación han sido investigados en ensayos clínicos, han surgido nuevas mutaciones de CLA resistentes a los inhibidores de CLA de segunda generación. Por ejemplo, la mutación G1202R se ha encontrado en tumores resistentes a crizotinib, ceritinib, y alectinib. (Politi K, *Clin Cancer Res.* **2014**, 20, 5576.) Nuevas isoformas de CLA consisten principalmente del dominio de la tirosina cinasa intracelular se encontró que se expresa en ~ 11 % de los melanomas y esporádicamente en otros tipos de cáncer humano, pero no en tejidos normales (Wiesner T, et al *Nature* **2015**, 526, 453–457). Estas nuevas isoformas de CLA estimulan las vías múltiples de señalización oncogénica, y son sensibles a los inhibidores de CLA, que sugieren potenciales beneficios clínicos de la inhibición de CLA.

Los cánceres pulmonares de célula no pequeña que albergan reordenamientos genéticos de CLA son sensibles al tratamiento con el inhibidor de CLA crizonitib. Sin embargo, la aparición de resistencia al fármaco es universal y rápidamente limita la aplicabilidad clínica. Los mecanismos de resistencia incluyen la amplificación del gen CLA, mutaciones sin sentido adquiridas por CLA, activación de la vía de derivación y la transición epitelial-mesenquimal (TEM) (Katayama R 2012). (Katayama R., et al *Sci Transl Med.* **2012**, 4(120):120ra17) La derivación y TEM constituyen la mayoría de la población de resistencia adquirida. Vale la pena tener en cuenta que 30-40 % de los pacientes con fusión de CLA positivo tienen resistencia intrínseca al tratamiento inhibidor de CLA. Los NSCLCs reordenados por CLA son normalmente adenocarcinoma caracterizado por un patrón de célula de anillo de sello sólido que con frecuencia está asociado a un fenotipo metastásico y vinculado a un fenotipo de transición epitelial-mesenquimal (TEM). (Voena C, et al. *Oncotarget*, **2016**, 23 de abril, 8955) La línea celular H2228 con un gen de fusión *EML4-ALK* v3 mostró un fenotipo mesenquimal suprimiendo directamente la E-cadherina y regulando a la alza la expresión de la vimentina, así como la expresión de otros genes involucrados en la TEM. La línea celular H2228 confiere una resistencia intrínseca a crizotinib y otros inhibidores de CLA. Por lo tanto, es necesario desarrollar un inhibidor de CLA polifarmacológico que sea capaz de dirigir la TEM y metástasis. La resistencia a la derivación se produce cuando el oncogén conductor original y una pista de derivación secundaria redundantemente mantiene la señalización

descendente para promover la supervivencia y proliferación celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la inhibición de CLA en modelos de CLA derivados de pacientes regula al alza la actividad de SRC. Se demostró que la combinación de un inhibidor de la tirosina cinasa Src con un inhibidor de CLA suprimía efectivamente la señalización descendente, que generó un efecto de inhibición sinérgica, y sensibilizó de nuevo a los inhibidores de CLA en los modelos de CLA derivados de los pacientes *in vitro* e *in vivo*. (Crystal AS, *Science*. **2014**, 346, 1480.) La identificación de nuevos inhibidores de CLA que pueden contrarrestar las amplias mutaciones de CLA secundarias incluyendo ALK^{G1202R} e inhibir la señalización Src será importante y altamente deseado para la efectiva superación de la resistencia al fármaco de CLA y mantener la respuesta al tratamiento del inhibidor de CLA.

La proteína ROS1 es una tirosina cinasa receptora, relacionada estrechamente al CLA/LTK y la familia de cinasa receptora de insulina. Aunque las funciones fisiológicas normales de la cinasa ROS1 humana no se han entendido completamente, la expresión anormal y las variables formas de fusión que se activan constitutivamente de la cinasa ROS1 se han reportado en un número de cánceres incluyendo glioblastoma, cáncer pulmonar de células no pequeñas, colangiocarcinoma, cáncer de ovario, adenocarcinoma gástrico, cáncer colorrectal, tumor miofibroblástico inflamatorio, angiosarcoma y hemangioendotelioma epiteloide. (Kurtis DD, et al *Clin Cancer Res* **2013**, 19 (15), 1.) La proteína de fusión FIG-ROS1 fue la primera proteína de fusión de ROS1 descubierta en 2003 en un glioblastoma multiforme humano. (Charest A, et al *Genes Chromosomes Cancer* **2003**, 37, 58) Varias proteínas de fusión con la cinasa ROS1 que incluyen TPM3 SDC4, SLC34A2, CD74, EZR y LRIG3 se han reportado de cánceres de pulmón humano, sugiriendo el papel oncogénico de la cinasa ROS1 en los cánceres de pulmón. (Takeuchi K, et al *Nat. Med.* **2012**, 18, 378) La encuesta de las tirosinas cinasas activadas con señalización en 23 pacientes con colangiocarcinoma confirmó la presencia de la fusión de cinasa FIG-ROS en 8,7 % de los pacientes de colangiocarcinoma. (Gu TL, et al *PLoS One*. **2011**, 6, e15640.) Más y más socios de fusión ROS1 incluyendo KDELRL2, CCDC6, MSN, LIMA1, CLTC, NFKB2, NCOR2, CEP85L, TMEM106B, HLA-A, MYO5A, PPFIBP1, ERC1, PWWP2A, CLIP1, ZCCHC8, SHTN1, TFG, y YWHAE, han sido reportados de varios cánceres humanos (Uquen A, et al *Future Oncol.* **2016**, 3 de junio, pub E antes de imprimir) Tomados en conjunto, la cinasa ROS1 es un candidato prometedor dirigido con base molecular para cánceres con actividades de cinasa ROS aberrantes. El inhibidor de CLA/MET/ROS1 crizotinib ha demostrado eficacia marcada en pacientes con NSCLC cuyos tumores son positivos para anomalías genéticas de ROS1. (Shaw AT, et al *N Engl J Med* **2015**, 372, 683). Como se esperó los pacientes de reordenamiento positivo de ROS1 que respondieron a crizotinib eventualmente experimentaron un progreso en la enfermedad. La mutación de ROS1^{G2032R} secundaria y la señalización de derivación están asociados con la resistencia. (Awad MM, et al *N Engl J Med* **2013**, 368, 2395) Es deseado desarrollar la siguiente generación del inhibidor de ROS1 para superar la resistencia.

Las tirosinas cinasas receptoras (Trks, por sus siglas en inglés) relacionadas con la tropomiosina son receptores de alta afinidad para las neurotrofinas (NTs), una familia de factor de crecimiento nervioso (NGF). Trk originalmente se clonó como un oncogén fusionado con el gen tropomiosina en el dominio extracelular. Las mutaciones de activación provocadas por los reordenamientos o mutaciones cromosomales en la familia de TRK han sido reportadas en muchos cánceres. (Vaishnavi A, et al *Cancer Discov.* **2015**, 5, 25) Debido a que las Trks juegan papeles importantes en la sensación de dolor, así como crecimiento de células tumorales y señalización de supervivencia, los inhibidores de las cinasas receptoras Trk pueden proporcionar beneficio para el tratamiento del dolor y cáncer.

La familia Janus de cinasas (JAKs, por sus siglas en inglés) incluye JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, y son tirosina cinasas no receptoras citoplásmicas requeridas para la señalización fisiológica de citocinas y factores de crecimiento. (Quintas-Cardama A, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011, 10(2), 127) La regulación aberrante de las vías JAK/STAT ha sido implicada en múltiples enfermedades patológicas humanas, incluyendo el cáncer (JAK2) y la artritis reumatoide (JAK1, JAK3). Una mutación de ganancia de función de JAK2 (JAK2V617F) ha sido descubierta con alta frecuencia en pacientes con MPN. (Levine RL, et al. *Cancer Cell* **2005**, 7, 387) La mutación en el dominio pseudocinasa JH2 de JAK2 lleva a la actividad constitutivamente cinasa. Las células que contienen la mutación JAK2V617F adquieren la capacidad de crecimiento independiente de citocina y a menudo se convierte en tumor, proporcionando una fuerte razón para el desarrollo de los inhibidores de JAK como una terapia dirigida. Además, la hiperactivación de JAK2/transductores de señal y activadores de la transcripción 3 (JAK2/STAT3) es responsable de una diferenciación celular dendrítica anormal que lleva a una diferenciación celular dendrítica anormal y acumulación de células mieloides inmunosupresivas en cáncer (Nefedova Y, et al. *Cancer Res* **2005**, 65, 9525). Los tumores senescentes que carecen de Pten, la activación de la vía JAK2/STAT3 establece un microentorno de tumor inmunosupresivo que contribuye al crecimiento tumoral y quimio resistencia (Toso A, et al. *Cell Reports* **2014**, 9, 75). Las fusiones del gen JAK2 con el TEL(ETV6) (TEL-JAK2) y genes PCM1 se han encontrado en pacientes con leucemia. (Lacronique V, et al. *Science* **1997**, 278, 5341, 1309–12. Reiter A, et al. *Cancer Res.* **2005**, 65, 7, 2662–7.) Se informó que la vía de señalización JAK/STAT3 fue aberrantemente incrementada en células de cáncer pulmonar de células no pequeñas mutantes (NSCLC) de EGFR resistentes al inhibidor de EGFR, y la inhibición de JAK2 que supera la resistencia adquirida a los inhibidores de EGFR que apoyan el uso de una terapia de combinación con inhibidores de JAK y EGFR para el tratamiento de NSCLC dependientes de EGFR. (Gao SP, et al. *Sci Signal.* **2016**, 9 (421):ra33) La señalización de JAK/STAT3 promueve los signos característicos del cáncer en el tumor y su entorno, que incluye la proliferación, supervivencia, angiogénesis, metabolismo tumoral mientras se suprime la inmunidad antitumoral. (Buchert M, et al. *Oncogene*, **2016**, 35, 939–951) La inhibición de la activación dependiente de citocina de la vía JAK/STAT3 con inhibidores de JAK también puede proporcionar oportunidades de tratamiento ortogonal para otras células cancerígenas adictas al oncogén que han ganado una resistencia al fármaco. Se observó una amplificación focal del gen JAK2 en cánceres de mama triple negativo (CMTNs) después de la quimioterapia en un grupo de tumores

amplificados en 9p24, que sugieren un papel en la tumorigenicidad y quimio resistencia. (Balko JM, *et al.* Sci Transl Med. **2016**, 8(334):ra53) Por lo tanto, la inhibición farmacológica de la vía de señalización de JAK2 puede ser una importante nueva estrategia terapéutica para mejorar la actividad antitumoral. c-Src es una tirosina cinasa no receptora. La familia de Src (SFK) comprende ocho miembros en humanos (Src, Fyn, Yes, Lyn, Lck, Hck, Blk y Fgr) con un peso molecular entre 52 – 62 KDa. Src y sus familiares están desregulados en muchos tipos de cáncer. Src es un transductor descendente clave de muchos RTKs, incluyendo EGFR, HER2, y c-Met. La activación de la señalización de Src ha sido implicada en otorgar resistencia terapéutica a terapias antiendócrinas dirigidas, terapias de tirosina cinasa receptora, quimioterapias tradicionales, y terapias de radiación. (Zhang S, *et al* Trends Pharmacol Sci. 2012, 33, 122). SRC puede promover la señalización de los receptores del factor de crecimiento en un número de maneras que incluyen la participación en las vías de señalización requeridas para la síntesis de ADN, control de la vuelta del receptor, reordenamiento del citoesqueleto de actina, migración, adherencia, invasión, motilidad, y supervivencia. (Bromann PA, Oncogene 2004, 23, 7957-7968) Un destacado papel de Src en los eventos relacionados con el progreso del tumor tales como la transición epitelial-mesénquima (TEM) y el desarrollo de metástasis han sido informados a través de la interacción con el potente supresor de la metástasis, gen N-myc regulado descendente N-myc 1 (NDRG1), que regula la migración de células cancerígenas por la inhibición de la actividad de Src. (Liu W, *et al.* Oncotarget. **2015**, 6: 35522-35541) Aunque los inhibidores de EGFR han logrado un éxito significativo en la mayoría de los pacientes con NSCLC que albergan mutaciones de activación de EGFR, un subconjunto de pacientes con mutaciones de EGFR son refractarios a EGFR-TKIs. La resistencia a los inhibidores de EGFR presuntamente implica la activación de SRC y la inducción de la transición epitelial-a-mesénquima (TEM). La resistencia principal a EGFR-TKIs está asociada con mayores niveles de la expresión de CRIPTO1. CRIPTO1 activó SRC y ZEB1 para promover la TEM por medio de la regulación a la baja de microARN-205 (miR-205). Por lo tanto, la dirección conjunta de EGFR y SRC puede superar la resistencia del inhibidor de EGFR intrínseca en pacientes con CRIPTO1-positivo, NSCLC mutado por EGFR. (Park, K-S, *et al.* J Clin Invest. **2014**, 124(7):3003–3015) La cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) es una tirosina cinasa no receptora de 125 kDa u juega un papel importante en la adherencia, supervivencia, motilidad, metástasis, angiogénesis, linfangiogénesis, funciones de células madre cancerígenas, microentorno tumoral y transición epitelial a mesénquima (TEM). (Golubovskaya VM, *Front Biosci* (Landmark Ed).; 19: 687–706) Las FAK nucleares controlan la transcripción de quimiocina, Tregs, y la evasión de la inmunidad antitumoral, y el inhibidor de molécula pequeña de la cinasa FAK VS-4718 lleva a la reducción de las Tregs y promueve una respuesta antitumoral mediada por la célula T CD8+. (Serrels A, *et al*, Cells **2015**, 163, 160-173). Por lo tanto, los inhibidores de FAK pueden provocar la regresión del tumor inmune-mediada. FAK es hiperactivada en el adenocarcinoma ductal pancreático humano (PDAC, por sus siglas en inglés) y se correlaciona con el microentorno inmunosupresivo de tumor (TME, por sus siglas en inglés). El dirigir la cinasa de adhesión focal representa cánceres pancreáticos sensibles a la inmunoterapia del punto de verificación superando el TME PDAC fibrótica e inmunosupresora en modelos de ratón. (Jiang H, *et al.* Nat Med. **2016**, 4 de jul [pub E antes de impresión]). Recientemente se informó que saracatinib, un inhibidor selectivo de SRC, puede volver a sensibilizar las líneas celulares resistentes al inhibidor de CLA, demostrando un papel terapéutico de la inhibición de SRC en la superación de la resistencia del inhibidor de CLA. (Crystal AS, *et al.* Science 2014, 346, 1480-1486) Por lo tanto, el inhibidor de Src/FAK puede jugar papeles importantes en los regímenes combinatorios en superar la resistencia a terapias anticancerígenas actuales y en la prevención de la reaparición metastásica, TEM y resistencia en el tratamiento contra cáncer. El miembro 5 de la familia de proteína cinasa activado por AMP (ARK5), también llamado NAUK1 es un regulador ascendente de AMPK y limita la síntesis de proteínas por inhibición de la vía de señalización de la rapamicina 1 (mTORC1). ARK5 mantiene la expresión de complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y la capacidad respiratoria para el metabolismo eficiente de glutamina. ARK5 se altamente expresado en tanto tejidos de NSCLC primarios como líneas celulares, está funcionalmente asociado con metástasis de NSCLC y un indicador de un mal pronóstico para los pacientes con NSCLC. ARK5 moduló la migración y la invasión de las células NSCLC y jugó papeles cruciales en la vía de mTOR. (Shi L, *et al.* Br J Cancer. **2014**, 111(12):2316-27) Se reportó que ARK5 confiere doxorubicinresistencia en HCC mediante la inducción de TEM. (Xu T, *et al.* Cancer Lett. **2016**, 377(2):140-8) La expresión desregulada de la oncoproteína MYC se asocia con muchos tumores humanos. MYC promueve el crecimiento y proliferación celular, y altera el metabolismo celular. La inhibición de ARK5 conduce a un colapso de los niveles celulares de ATP en las células que expresan MYC desregulado, y prolonga la supervivencia en modelos de ratón impulsado por MYC de carcinoma hepatocelular. (Liu L, *et al.* Nature, **2012**, 483, 608-612) Por lo tanto, el dirigir la homeostasis de la energía celular por el inhibidor de ARK5 es una estrategia terapéutica válida para eliminar las células tumorales con expresión de MYC desregulado.

Src es una tirosina cinasa no receptora que es desregulada en muchos tipos de cáncer, y un transductor descendente clave de muchos RTKs, que incluyen EGFR, HER2, y c-Met La activación de la señalización de Src ha sido implicada en conferir la resistencia terapéutica a terapias antiendócrinas dirigidas, terapias de tirosina cinasa receptoras, quimioterapias tradicionales, y terapias de radiación. (Zhang S, *et al* Trends Pharmacol Sci. 2012, 33, 122). El inhibidor de Src puede jugar papeles importantes en los regímenes combinatorios en superar la resistencia a las terapias anticancerígenas actuales y en prevenir la reaparición metastásica. Las tirosinas cinasas citoplasmáticas (también conocidas como tirosinas cinasas no receptoras) de la familia Src (SFKs) desempeñan papeles importantes en la transducción de la señal inducida por un gran número de estímulos extracelulares incluyendo factores de crecimiento e integrinas. Una actividad elevada de SFK se encuentra en más del 80 % del cáncer colorrectal humano (CCR) y esto se ha asociado con un resultado clínico malo. (Summy JM, *et al.* Cancer Metastasis Rev. **2003**, 22, 337–358) El miembro SFK sí regula vías de señalización oncogénicas específicas importantes para el progreso del cáncer de colon que no se comparte con c-Src. (Scancier F. *et al.* PLoS One. **2011**, 6(2): e17237) Los genes de fusión WASF2-FGR

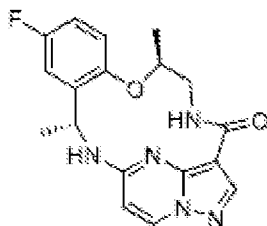
se encontraron en carcinoma escamoso pulmonar, cistoadenocarcinoma seroso ovárico, y melanoma cutáneo de piel. (Stransky N, *et al. Nature Communications* 2014, 5, 4846) Los cánceres de mama positivos en receptor de estrógeno (ER⁺) se adaptan a la privación de hormonas y se vuelven resistentes a la terapia antiestrogénica. Las mutaciones en el dominio SH2 inhibidor de la cinasa de la familia SRC (SFK) LYN fueron relacionada a tumores ER⁺ que permanecieron altamente proliferativos después del tratamiento con el letrozol inhibidor de aromatasa. LYN fue regulado al alza en múltiples líneas de cáncer de mama ER⁺ resistentes a la privación de estrógeno a largo plazo. (Schwarz LJ, *et al. J Clin Invest.* **2014**, 124, 5490-5502) Por lo tanto, dirigir LYN será una estrategia racional que supera el escape de antiestrógenos en un subconjunto de cánceres de mama ER⁺. Se informó que LYN fue sobreexpresada en el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRP, por sus siglas en inglés), mayor actividad transcripcional de AR y una acelerada progresión de CRPC y dirigir la cinasa Lyn indujo una disociación de AR del chaperón molecular Hsp90, llevando a su ubiquitinación y degradación proteasomal. (Zardan A., *et al. Oncogenesis* **2014**, 3, e115) La tirosina cinasa Lyn es un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de CRPC. La cinasa de la familia Src FYN está involucrada en las vías de transducción de señal en el sistema nervioso, así como el desarrollo y activación de linfocitos T bajo condiciones fisiológicas normales. La activación de Fyn se observa en varios tipos de cáncer, incluyendo cánceres de próstata y de mama, carcinoma de células escamosas, melanoma y glioblastoma. (Elias D., *et al. Pharmacological Research* **2015**, 100, 250-254) Fyn fue regulado a la alza en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a tamoxifen y juega un papel clave en el mecanismo de resistencia. Los linfomas de célula T periféricos (PTCLs, por sus siglas en inglés) son un grupo heterogéneo de linfomas no de Hodgkin agresivos con mal pronóstico. Las mutaciones que activan FYN se encontraron en PTCL, y promueve el crecimiento de las células transformadas por medio de la expresión de alelos mutantes de FYN activados. Los inhibidores de la cinasa SRC pueden jugar papeles importantes en el tratamiento de PTCLs. (Couronne L, *et al. Blood* 2013, 122, 811).

Los receptores de dominio discoidina (DDR, por sus siglas en inglés) son activados por colágenos de la matriz y han sido implicados en numerosas funciones celulares tales como proliferación, diferenciación, adhesión, migración e invasión. Los DDRs desempeñan un papel en el progreso del cáncer mediante la regulación de las interacciones de las células tumorales con su matriz de colágeno circundante. El DDR1 es un objetivo transcripcional de p53 directo, y la activación de DDR1 se asocia con daño del ADN dependiente de p53. El DDR activó la cascada MAPK de una manera dependiente de Ras. La inhibición de la función de DDR1 condujo a una apoptosis creciente de células que contienen p53 tipo silvestre en respuesta al estrés genotóxico a través de una vía dependiente de la caspasa. (Ongusaha PP, *et al. EMBO J.* **2003**, 22, 1289-1301) Los DDRs se identificaron como uno de varias principales tirosinas cinasas activadas que llevan mutaciones somáticas en cáncer de pulmón (Hammerman PS, *et al. Cancer Discov.* **2011**, 1, 78-89.), el cáncer endometrial de células claras y seroso (Rudd ML, *et al. BMC Cancer* **2014**, 14, 884), así como en la leucemia mieloide aguda. (Tomasson MH, *et al. Blood* 2008, 111:4797-4808) El adenocarcinoma de pulmón mutante del homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten avanzado (KRAS) es desafiante debido a la falta de terapias dirigidas efectivas. La inhibición concomitante de DDR1 y la señalización de Muesca indujo la regresión de KRAS; Los xenoinjertos de pulmón derivados de paciente con mutante de TP53, que indican la inhibición combinada de DDR1 y señalización de Muesca puede ser una terapia dirigida efectiva para pacientes con adenocarcinoma de pulmón mutante de KRAS. (Ambrogia C, *et al. Nature Medicine*, 2016, 22, 270-277).

Es deseable preparar compuestos que tienen actividad contra inhibidores de cinasa que dirige la enfermedad, especialmente compuestos que tienen actividad contra múltiples cinasas, incluyendo contra múltiples cinasas alteradas genéticamente para uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades. Nuevos compuestos con perfiles polifarmacológicos también se desean para dirigir los conductores de oncogén primarios y sus mecanismos de resistencia adquirida incluyendo mutaciones secundarias, señalización de camino, TEM, estaminalidad de cáncer y metástasis.

Breve descripción de la invención

El compuesto (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazacilotridecin-4(5H)-ona (también mencionado en el presente documento como "Compuesto 1"), representado por la fórmula

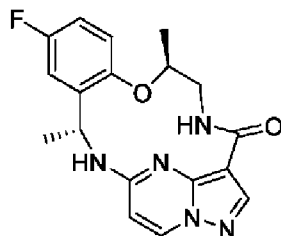


ha mostrado ser un inhibidor de cinasa multiobjetivo de molécula pequeña potente que muestra actividad contra el tipo silvestre y CLA mutante (cinasa de linfoma anaplásico), tipo silvestre y ROS1 mutante (tirosina cinasa receptora de proto-oncogen ROS1), la familia TRK de cinasas (tirosinas cinasas receptoras relacionadas con tropomiosina,

TRKA/B/C), JAK2 de la familia Janus de cinasas y SRC (familia c-Src de proteína tirosinas cinasas (SFKs)). El compuesto 1 tiene propiedades, incluyendo propiedades antitumorales, que son farmacológicamente mediadas a través de la inhibición de tirosinas cinasas receptoras y no receptoras. El compuesto 1 está divulgado en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2015/012597.

5

La presente invención proporciona un compuesto (7*S*,13*R*)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-*f*][1,4,8,10]benzoxatriaza-ciclotridecin-4(5*H*)-ona, que tiene la fórmula



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por

15

(i) una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión EML4-CLA que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en L1196M, G1202R, D1203R, L1152P/R, F1174C/L/V, C1156Y, I1171N, G1123S, S1206Y, G1269S/A e inserción de 1151T.; o

(ii) una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión TPR-CLA que tiene una mutación puntual L1196M, o

20

(iii) una CLA genéticamente alterada que tiene una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en R1050H, F1174C//L/S/V, F1245C//L/V, R1275L/Q, T1151M, M1166R, I1170N, I1170S, I1171N, I1183T, L1196M, A1200V, L1204F, L1240V, D1270G, Y1278S, R1192P, G1128A, G1286R, y T1343I; o

(iv) una proteína de fusión LMNA-TRKA; o

(v) una proteína de fusión QKI-TRKB o ETV6-TRKB; o

(vi) una proteína de fusión ETV6-TRKC.

25

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer mediado por una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión EML4-CLA que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en L1196M, G1202R, D1203R, L1152P/R, F1174C/L/V, C1156Y, I1171N, G1123S, S1206Y, G1269S/A, e inserción de 1151T.

30

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer mediado por una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión TPR-CLA que tiene una mutación puntual L1196M.

35

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer mediado por CLA que tiene una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en R1050H, F1174C//L/S/V, F1245C//L/V, R1275L/Q, T1151M, M1166R, I1170N, I1170S, I1171N, I1183T, L1196M, A1200V, L1204F, L1240V, D1270G, Y1278S, R1192P, G1128A, G1286R, y T1343I. En algunas realizaciones, la mutación puntual es una mutación en el F1174. En algunas realizaciones, la mutación puntual es una mutación de CLA en el F1245. En algunas realizaciones, la mutación puntual es una mutación de CLA en el R1275.

40

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer mediado por una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína codificada por un gen TRKA y un fragmento de una proteína codificada por un gen LMNA. En algunas realizaciones, el TRKA genéticamente alterado es una proteína de fusión LMNA-TRKA. En algunas realizaciones, la proteína de fusión LMNA-TRKA es una proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión LMNA-TRKA comprende al menos una mutación de resistencia. En algunas realizaciones, la proteína de fusión LMNA-TRKA es una proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión LMNA-TRKA comprende al menos una mutación de resistencia que comprende una mutación puntual G595R.

45

50

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer mediado por una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína codificada por un gen TRKB y un fragmento de una proteína codificada por un gen QKI o gen TEL. En algunas realizaciones, la enfermedad o cáncer es un cáncer mediado por una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína codificada por un gen TRKB y un fragmento de una proteína codificada por un gen QKI. En algunas realizaciones, la enfermedad o cáncer es un cáncer mediado por una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína codificada por un gen TRKB y un fragmento de una proteína codificada por un gen TEL. En algunas realizaciones, el TRKB genéticamente alterado es una proteína de fusión QKI-TRKB o TEL-TRKB. En algunas realizaciones, el TRKB genéticamente alterado es una proteína de fusión TEL-TRKB. En algunas realizaciones, el TRKB genéticamente alterado es una proteína de fusión QKI-TRKB. En algunas realizaciones, la proteína de fusión QKI-TRKB o TEL-TRKB es una proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de

55

- fusión QKI-TRKB es una proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión TEL-TRKB es una proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión QKI-TRKB o TEL-TRKB comprende al menos una mutación de resistencia. En algunas realizaciones, la proteína de fusión QKI-TRKB comprende al menos una mutación de resistencia. En algunas realizaciones, la proteína de fusión TEL-TRKB comprende al menos una mutación de resistencia. En algunas realizaciones, la proteína de fusión TEL-TRKB comprende una mutación puntual G639R.
- En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer mediado por una proteína de fusión que comprende un fragmento de una proteína codificada por un gen TRKC y un fragmento de una proteína codificada por un gen ETV6. En otras realizaciones, el TRKC alterada genéticamente es una proteína de fusión ETV6-TRKC. En algunas realizaciones, la proteína de fusión ETV6-TRKC es una proteína de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión ETV6-TRKC comprende al menos una mutación de resistencia. En algunas realizaciones, la proteína de fusión ETV6-TRKC comprende una mutación puntual G623R.
- En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que presenta resistencia a la derivación.
- En algunas realizaciones, el cáncer es seleccionado del grupo que consiste en ALCL, NSCLC, neuroblastoma, tumor miofibroblástico inflamatorio, carcinoma de células renales adultas, carcinoma de células renales pediátricas, cáncer de mama, adenocarcinoma de colon, glioblastoma, glioblastoma multiforme y cáncer de tiroides anaplásico.
- En algunas realizaciones, el cáncer es NSCLC.
- En algunas realizaciones, el paciente ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, el paciente ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer y el cáncer ha desarrollado resistencia a la terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, la resistencia es una resistencia intrínseca primaria. En algunas realizaciones, la resistencia es una resistencia adquirida de la mutación(es). En algunas realizaciones, la resistencia es una resistencia a la derivación. En algunas realizaciones, la resistencia es una resistencia basada en TEM.
- Realizaciones adicionales, características y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a través de la práctica de la divulgación. El compuesto de la presente divulgación puede describirse en cualquiera de las siguientes realizaciones
- En una realización, la invención proporciona un compuesto (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5H)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión EML4-CLA que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en L1196M, G1202R, D1203R, L1152P/R, F1174C/L/V, C1156Y, I1171N, G1123S, S1206Y, G1269S/A, e inserción de 1151T.
- En una realización, la mutación es L1196M.
- En una realización, la mutación es G1202R.
- En una realización, la mutación es L1152P.
- En una realización, la mutación es F1174C.
- En una realización, la mutación es C1156Y.
- En una realización, la mutación es I1171N.
- En una realización, la mutación es G1269S.
- En una realización, la mutación es la inserción de 1151T.
- En una realización, la invención proporciona un compuesto (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5H)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión TPR-CLA que comprende una mutación puntual L1196M.
- En una realización, la invención proporciona un compuesto (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5H)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por una CLA genéticamente alterada que tiene una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en R1050H, F1174C/I/L/S/V, F1245C/I/L/V, R1275L/Q, T1151M, M1166R, I1170N, I1170S, I1171N, I1183T, L1196M, A1200V, L1204F, L1240V, D1270G, Y1278S, R1192P, G1128A, G1286R, y T1343I.

En una realización, la mutación puntual es una mutación de CLA en F1174.

En una realización, la mutación puntual es una mutación de CLA en F1245.

5

En una realización, la mutación puntual es una mutación de CLA en R1275.

En una realización, el cáncer es seleccionado del grupo que consiste en ALCL, NSCLC, neuroblastoma, tumor miofibroblástico inflamatorio, carcinoma de células renales adultas, carcinoma de células renales pediátricas, cáncer de mama, adenocarcinoma de colon, glioblastoma, glioblastoma multiforme y cáncer de tiroides anaplásico.

10

En una realización, el cáncer es NSCLC.

En una realización, la invención proporciona un compuesto (7*S*,13*R*)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahydro-1,15-etenopirazolo[4,3-*f*][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5*H*)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por una TRKA genéticamente alterada que es una proteína de fusión LMNA-TRKA.

15

En una realización, la proteína de fusión LMNA-TRKA es una proteína de tipo silvestre.

20

En una realización, la proteína de fusión LMNA-TRKA comprende al menos una mutación de resistencia, incluyendo una proteína de fusión de LMNA-TRKA que comprende una mutación puntual de G595R.

En una realización, la invención proporciona un compuesto (7*S*,13*R*)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahydro-1,15-etenopirazolo[4,3-*f*][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5*H*)-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por QKI-TRKB o TEL-TRKB, incluyendo TEL-TRKB que comprende una mutación puntual de G639R.

25

En una realización, el cáncer es mediado por una proteína de fusión ETV6-TRKC, incluyendo una proteína de fusión ETV6-TRKC genéticamente alterada, incluyendo una proteína de fusión ETV6-TRKC que comprende una mutación puntual de G623R.

30

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra el efecto del Compuesto 1 en la apoptosis de células Karpas-299. La figura 1B muestra la apoptosis de las células Karpas-299 después de la incubación en varias concentraciones del Compuesto 1 durante 48 horas; La figura 1C muestra que las células Karpas-299 fueron recolectadas, lisadas y analizadas por SDS-PAGE y puestas en western blot con anticuerpos de PARP y Actina.

35

La figura 2 muestra el efecto del Compuesto 1 en la cicatrización de heridas en células HCC78 y HT-1080.

40

La figura 3 muestra geles que demuestran que el Compuesto 1 regula a la baja la expresión de EGFR. La figura 3A muestra resultados después de una exposición de 4 horas al Compuesto 1 a 0 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM y 1000 nM; La figura 3A muestra resultados después de una exposición de 24 horas al Compuesto 1 a 0 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM y 1000 nM.

La figura 4 muestra geles que demuestran que el Compuesto 1 regula a la baja la expresión de CD44 en comparación con el mismo experimento con crizotinib que no muestra la regulación a la baja de la expresión de CD44. La figura 4A muestra resultados después de la exposición al Compuesto 1 a 0 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM y 1000 nM; La figura 4A muestra resultados después de la exposición a crizotinib a 0 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM y 1000 nM.

45

La figura 5 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo Karpas-299 *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 50 mg/kg.

50

La figura 6 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo Karpas-299 *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 50 mg/kg.

La figura 7 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo NIH3T3 EML4-ALK WT *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 50 mg/kg.

55

La figura 8 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo NIH3T3 EML4-ALK WT *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 50 mg/kg.

La figura 9 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo NIH3T3 SDC4-ROS1 WT *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 50 mg/kg.

La figura 10 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo KM12 *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

60

La figura 11 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo KM12 *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 12 muestra la inhibición de la fosforilación de NPM-ALK por el Compuesto 1 en el modelo Karpas-299 *in vivo*.

La figura 13 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo KM12 *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 1 mg/kg, (●) 3 mg/kg, (▲) 15 mg/kg.

65

La figura 14 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo KM12 *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 1 mg/kg, (●) 3 mg/kg, (▲) 15 mg/kg.

La figura 15 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo Ba/F3 EML4-ALK WT *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 16 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo Ba/F3 EML4-ALK WT *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 17 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo Ba/F3 EML4-ALK G1202R *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 18 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo Ba/F3 EML4-ALK G1202R *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 19 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo Ba/F3 CD74-ROS1 WT *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 20 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo Ba/F3 CD74-ROS1 WT *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 21 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 22 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 15 mg/kg, (●) 75 mg/kg.

La figura 23 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo NIH3T3 LMNA-TRKA WT *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 3 mg/kg, (●) 15 mg/kg.

La figura 24 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo NIH3T3 LMNA-TRKA WT *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 3 mg/kg, (●) 15 mg/kg.

La figura 25 muestra el efecto del Compuesto 1 en el crecimiento del tumor en el modelo NIH3T3 LMNA-TRKA G595R *in vivo* en varias dosis, (○) control, (■) 3 mg/kg, (●) 15 mg/kg, (▲) 60 mg/kg.

La figura 26 muestra la estabilidad del peso corporal del animal en el modelo NIH3T3 LMNA-TRKA G595R *in vivo* después de la administración del Compuesto 1 en varias dosis, (○) control, (■) 3 mg/kg, (●) 15 mg/kg, (▲) 60 mg/kg.

Descripción detallada de la invención

Antes de que la presente divulgación sea además descrita, debe entenderse que esta divulgación no está limitada a realizaciones particulares descritas, como puede ser, por supuesto, éstas varían. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es para el propósito de describir sólo realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente divulgación será limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia a la que esta divulgación pertenece. Si una definición establecida en esta sección es contraria o de otra manera inconsistente con una definición establecida en una patente, solicitud, u otra publicación a la que se hace referencia en el presente documento, la definición establecida en esta sección prevalece sobre la definición a la que se hace referencia en el presente documento.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" "la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se señala además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base previa para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la recitación de elementos de reclamo, o uso de una limitación "negativa".

Como se utiliza en el presente documento "que incluye", "que contiene", y "que comprende" se utilizan en su sentido abierto, no limitado.

Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas aquí no están calificadas con el término "alrededor de". Se entiende que, ya sea que el término "alrededor de" se use explícitamente o no, cada cantidad dada en este documento pretende referirse al valor real dado, y también pretende referirse a la aproximación a dicho valor dado que razonablemente se inferiría basado en el conocimiento ordinario en la materia, incluyendo equivalencias y aproximaciones debido a las condiciones de medición y / o experimentales para dicho valor dado. Cuando un rendimiento se da como un porcentaje, dicho rendimiento se refiere a una masa de la entidad para la que se dan rendimientos con respecto a la cantidad máxima de la misma entidad que podría obtenerse bajo las condiciones estequiométricas particulares. Las concentraciones que se dan como porcentajes se refieren a proporciones de masa, a menos que se indique lo contrario.

Excepto que se indique lo contrario, los métodos y técnicas de las presentes realizaciones se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la materia y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente descripción. Véase, por ejemplo, Loudon, *Organic Chemistry*, Cuarta Edición, Nueva York: Oxford University Press, 2002, pp. 360-361, 1084-1085; Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, y Structure*, Quinta Edición, Wiley-

Interscience, 2001.

Definiciones

5 Como se utiliza en este documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que tienen
contraiones que pueden ser utilizados en productos farmacéuticos. Ver, generalmente, S.M. Berge, *et al.*,
"Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son
aquellas que son farmacológicamente eficaces y adecuadas para el contacto con los tejidos de sujetos sin excesiva
10 toxicidad, irritación o reacción alérgica. Un compuesto descrito en el presente documento puede poseer un grupo
suficientemente ácido, un grupo lo suficientemente básico, ambos tipos de grupos funcionales, o más de uno de cada
tipo y reaccionan en consecuencia con un número de bases orgánicas o inorgánicas y ácidos orgánicos e inorgánicos,
para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Dichas sales incluyen:

- 15 (1) sales de adición ácidas, que pueden obtenerse por reacción de la base libre del compuesto original con ácidos
inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido
perclórico y similares, o con ácidos orgánicos como el ácido acético, ácido oxálico, (D) o (L) ácido málico, ácido
maleico, ácido sulfónico de metano, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico, ácido tartárico,
ácido cítrico, ácido succínico o el ácido malónico y similares; o
- 20 (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original sea reemplazado por un ion metálico,
p. ej., un ion metálico alcali, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal
como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trimetamina, N-metilglucamina, y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la materia, y puede contemplarse
cualquiera de dicha sal farmacéuticamente aceptable con respecto a las realizaciones aquí descritas. Ejemplos de
25 sales farmacéuticamente aceptables son sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrógeno
fosfatos, dihidrógenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos,
decanoatos, caprilatos, acrilatos, formatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos,
succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1, 4-dioatos, hexino-1, 6-dioatos, benzoatos,
clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos,
30 metilsulfonatos, propilsulfonatos, besilatos, xilenosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos,
fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ-hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos y mandelatos. Se
encuentran listas de otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences,
17^o ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985.

35 Para el Compuesto 1 que contiene un nitrógeno básico, se puede preparar una sal farmacéuticamente aceptable
mediante cualquier método adecuado disponible en la materia, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido
inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, sulfúrico, ácido, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido bórico,
ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido fenilacético, ácido propiónico, ácido
esteárico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido
40 valérico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido oleico,
ácido palmítico, ácido láurico, un ácido piranosidílico, como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa-
hidroxi, como ácido mandélico, ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, como ácido aspártico o ácido glutámico,
un ácido aromático, como ácido benzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido naftoico o ácido cinámico, un ácido
sulfónico, como ácido laurilsulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido metanosulfónico o ácido etanosulfónico, o
45 cualquier mezcla compatible de ácidos tales como los dados aquí como ejemplos, y cualquier otro ácido y mezcla de
los mismos que se consideran equivalentes o sustitutos aceptables a la luz del nivel ordinario de conocimiento en esta
tecnología.

Como se utiliza en este documento, el término "genéticamente alterado" se refiere a una alteración permanente en la
50 secuencia del ADN que constituye un gen que puede resultar en un cambio en la secuencia de la proteína codificada
por el gen. Un gen que es "genéticamente alterado" como se describe en este documento, puede poseer cambios en
la secuencia del ADN y/o secuencia de la proteína codificada por la secuencia de ADN, que varían en tamaño; por
ejemplo, un nucleótido (también conocido como un polimorfismo de nucleótido único, SNP o mutación puntual), un
polimorfismo de múltiples nucleótidos (MNP), por sus siglas en inglés), un gran segmento de un cromosoma que
55 incluye múltiples genes, tales como una fusión de genes y similares. Ejemplos de fusiones de genes incluyen, pero no
se limitan a, aquellas que son el resultado de una inversión cromosómica en la que una porción de un ADN
cromosómico codifica uno o más reordenamientos genéticos para proporcionar una fusión de dos genes no
ordinariamente en comunicación en la secuencia de ADN, tal como EML4-ALK (ver por ejemplo, Soda, M. *et al.*,
Nature, **2007**, 448, 561-567), aquellos que son el resultado de una eliminación en la secuencia de ADN (una
60 "eliminación intersticial") en que parte de una secuencia de ADN de un cromosoma es eliminada para proporcionar
una fusión de dos genes no ordinariamente en comunicación con la secuencia de ADN, tal como TMPRSS2-ERG (ver
por ejemplo, Yu J. *et al.*, *Cancer Cell*, **2010**, 17, 5, 443-54), o aquellos que son el resultado de una translocación en la
que una porción del ADN cromosómico es dividido e insertado en el mismo o en otro cromosoma para proporcionar
una fusión de dos genes no ordinariamente en comunicación en la secuencia de ADN, tal como BCR-ABL (ver por
65 ejemplo, Advani, A.S. *et al. Leukemia Research*, **2002**, 26, 8, 713-720). Un experto en la materia fácilmente apreciará
que dichas fusiones de genes se pueden encontrar en múltiples variantes que dependen del individual en el que la

fusión de genes se ha producido, y cada una de dichas variantes es contemplada por los métodos descritos en el presente documento.

Un gen "genéticamente alterado", o la proteína codificada por estos genes, puede producir como las mutaciones hereditarias que pueden ser heredadas de un padre y se refieren a veces como mutaciones de la línea germinal, o un gen "genéticamente alterado" o la proteína codificada por estos genes, pueden producirse como una mutación adquirida (o somática) que se produce en algún momento durante la vida de una persona. En algunos casos, un gen "genéticamente alterado" se puede describir como una mutación de novo (nueva) y puede ser hereditario o somático. Se entenderá además que "genéticamente alterado" puede referirse a una situación en que más de uno de los cambios en la secuencia de ADN aquí descrita puede producirse en un paciente al mismo tiempo, como un SNP (o mutación puntual) y una translocación. Dichas situaciones pueden surgir de, pero no solamente son el resultado de, la llamada "resistencia adquirida" en la cual un paciente que ha sido tratado con un inhibidor de cinasa puede desarrollar una mutación en la secuencia de ADN que reduce la efectividad del tratamiento. Los ejemplos no limitantes de dichas mutaciones de resistencia adquirida incluyen la mutación puntual de L1196M, G1202R, L1152P, F1174C, C1156Y, I1171N, G1269S, y la inserción de 1151T que se produce en la fusión de genes EML4-CLA.

Como se utiliza en este documento, el término "resistencia intrínseca" se refiere a la resistencia preexistente de las células de la enfermedad, especialmente las células cancerosas, para tratamiento con fármacos, especialmente el tratamiento de quimioterapia. Se apreciará que la resistencia intrínseca puede resultar en la resistencia de las células a un fármaco único, un pequeño grupo de fármacos estructuralmente relacionado, o varios fármacos de diferentes estructuras químicas (llamada "resistencia a múltiples fármacos" o "RMF"). (Monti, E. **2007**. Molecular Determinants of Intrinsic Multidrug Resistance in Cancer Cells and Tumors In B. Teicher (Ed.), *Cancer Drug Resistance* (pp. 241-260). Totowa, Nueva Jersey: Humana Press Inc.). Se apreciará que la resistencia intrínseca puede ser el resultado de uno o más factores relacionados con el hospedero y/o la composición genética de las células. Dichos factores incluyen, pero no están limitados a la inmunomodulación; factores farmacogenéticos tales como la imposibilidad de alcanzar niveles óptimos de fármacos en plasma debido a ADME alterado o baja tolerancia a los efectos secundarios inducidos por el fármaco; acceso restringido del fármaco al sitio del tumor; y desencadenantes microambientales. Dichos factores de composición genética incluyen, pero no se limitan a la expresión alterada de transportadores de fármaco; alteraciones cualitativas de los objetivos del fármaco; alteraciones cuantitativas de los objetivos del fármaco; cambios en el manejo/metabolismo del fármaco intracelular; cambios en las actividades de reparación del ADN y alteración en vías apoptóticas. (Gottesman, M.M., *Annu. Rev. Med.*, **2002**, 53, 516-527).

Como se utiliza en este documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que desencadena la respuesta biológica o medicinal en un paciente, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva es esa que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas. El nivel de dosis terapéutico efectivo específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno bajo tratamiento y la severidad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, género y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentemente con el compuesto específico empleado; y factores similares. Una dosis ejemplar está en el rango de alrededor de 0,1 mg a 1 g diario, o alrededor de 1 mg a 50 mg diario, o alrededor de 50 a 250 mg diario, o alrededor de 250 mg a 1 g diario. La dosis total puede administrarse en dosis unitarias únicas o divididas (por ejemplo, BID, TID, QID).

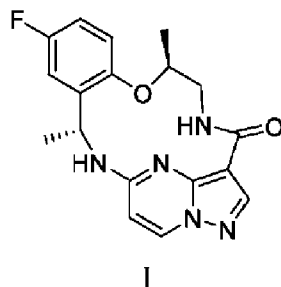
Como se utiliza en este documento, el término "enfermedad" incluye el cáncer.

Como se utiliza en este documento, el término "cáncer" incluye, pero no está limitado a ALCL, NSCLC, neuroblastoma, tumor miofibroblástico inflamatorio, carcinoma de células renales adultas, carcinoma de células renales pediátricas, cáncer de mama, cáncer de mama ER⁺, adenocarcinoma colónico, glioblastoma, glioblastoma multiforme, cáncer anaplásico de tiroides, colangiocarcinoma, cáncer de ovario, adenocarcinoma gástrico, cáncer colorrectal, tumor miofibroblástico inflamatorio, angiosarcoma, hemangioendotelioma epitelioides, colangiocarcinoma intrahepático, cáncer papilar de tiroides, neoplasias spitzoides, sarcoma, astrocitoma, glioma cerebral de grado inferior, carcinoma secretor de la mama, carcinoma análogo mamario, leucemia mieloide aguda, nefroma mesoblástico congénito, fibrosarcomas congénitas, leucemia linfoblástica aguda tipo Ph, carcinoma de tiroides, melanoma cutáneo de la piel, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, glioma pediátrico de la CML, cáncer de próstata, carcinoma escamoso de pulmón, cistadenocarcinoma seroso de ovario, melanoma cutáneo de la piel, cáncer de próstata resistente a la castración, linfoma de Hodgkin, y cáncer endometrial de células claras y serosas.

Realizaciones

En algunas realizaciones, el Compuesto 1 descrito en el presente documento es para uso en métodos para el tratamiento del cáncer que comprenden administrar a un paciente en necesidad de tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene actividad contra al menos una tirosina cinasa seleccionada de CLA, TRKA, TRKB y TRKC genéticamente alteradas como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el compuesto tiene actividad contra al menos una tirosina o cinasa serina/treonina seleccionada del

grupo que consiste en CLA, ROS1, TRKA, TRKB, TRKC, JAK2, SRC, FAK y ARK5, siendo al menos una CLA, TRKA, TRKB o TRKC genéticamente alterada como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el compuesto tiene actividad contra al menos dos tirosinas o cinasas serina/treonina seleccionadas del grupo que consiste en CLA, ROS1, TRKA, TRKB, TRKC, JAK2, SRC, FAK y ARK5, siendo al menos una CLA, TRKA, TRKB o TRKC genéticamente alterada como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la al menos una, o la al menos dos de tirosina o cinasa serina/treonina son alteradas genéticamente. El compuesto es de la fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

De acuerdo con la presente divulgación, el cáncer mediado por o asociado con una tirosina cinasa genéticamente alterada incluye pero no se limita a ALCL, NSCLC, neuroblastoma, tumor miofibroblástico inflamatorio, carcinoma de células renales adultas, carcinoma de células renales pediátricas, cáncer de mama, adenocarcinoma colónico, glioblastoma, glioblastoma multiforme, cáncer anaplásico de tiroides, colangiocarcinoma, cáncer de ovario, adenocarcinoma gástrico, cáncer colorrectal, tumor miofibroblástico inflamatorio, angiosarcoma, hemangioendotelioma epiteloide, colangiocarcinoma intrahepático, cáncer papilar de tiroides, neoplasias spitzoides, sarcoma, astrocitoma, glioma cerebral de grado inferior, carcinoma secretor de la mama, carcinoma análogo mamario, leucemia mieloide aguda, nefroma mesoblástico congénito, fibrosarcomas congénitas, leucemia linfoblástica aguda tipo Ph, carcinoma de tiroides, melanoma cutáneo de la piel, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, glioma pediátrico de la CML y cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer es NSCLC.

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere al tratamiento del cáncer en un paciente que ha recibido un tratamiento previo con uno o más agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, el paciente ha sido tratado previamente con uno o más agentes quimioterapéuticos. En todavía otras realizaciones, la patente ha sido previamente tratada con uno o más agentes quimioterapéuticos y desarrolló una resistencia adquirida al tratamiento. En todavía otras realizaciones, la patente ha sido previamente tratada con uno o más agentes quimioterapéuticos y desarrolló una resistencia a la derivación al tratamiento. En todavía otras realizaciones, la patente ha sido previamente tratada con uno o más agentes quimioterapéuticos y desarrolló una resistencia a la derivación al tratamiento regulado por SRC o JAK2.

Otros agentes quimioterapéuticos con los que el paciente pudo haber sido tratado antes del tratamiento con el compuesto descrito en el presente documento incluyen pero no se limitan a inhibidores de cinasa, adrenocorticoides y corticoesteroides, agentes alquilantes, inhibidores de la transducción de señal peptidomimética, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, aclamicina y derivados de aclamicina, estrógenos, antimetabolitos, compuestos de platino, amanitinas, alcaloides vegetales, mitomicinas, discodermólidas, inhibidores de microtúbulo, epotilones, agentes inflamatorios y proinflamatorios, análogos de purinas, análogos de pirimidina, camptotecinas y dolastatinas. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico que recibió el paciente previo al tratamiento con uno o más compuestos aquí descritos pueden ser uno o más de afatinib, axitinib, alectinib, bosutinib, brigatini, cabozatinib, ceritinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, gefitinib, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, nintedanib, palbociclib, pazopanib, ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, sirolimus, sorafenib, sunitinib, tofacitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib, vemurafenib, metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucil, cisplatino, tamoxifeno, taxol, paclitaxel, docetaxel, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, daunomicina, rizoxina, prednisona, hidroxiurea, tenipósido, vincristina, vinblastina, eribulina, camptotecina, irinotecán, geldanamicina, estramustina y nocodazol. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente proporcionan tratamiento de un paciente previamente tratado con un inhibidor de cinasa seleccionado del grupo que consiste en afatinib, alectinib, axitinib, bosutinib, brigatini, cabozatinib, ceritinib, crizotinib, dabrafenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, gefitinib, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, nintedanib, palbociclib, pazopanib, ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, sirolimus, sorafenib, sunitinib, tofacitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib y vemurafenib. En algunas realizaciones, el paciente ha sido tratado previamente con crizotinib.

Composiciones farmacéuticas

Para el propósito de tratamiento, las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto descrito en el presente documento pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Un

excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que no es tóxica y de lo contrario biológicamente adecuada para la administración a un sujeto. Dichos excipientes facilitan la administración de los compuestos descritos y son compatibles con el ingrediente activo. Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizadores, lubricantes, surfactantes, diluyentes, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes, agentes

Las composiciones estériles también se contemplan por la invención, incluyendo composiciones de acuerdo con las regulaciones nacionales y locales que rigen tales composiciones.

Las composiciones farmacéuticas y el compuesto aquí descritos se pueden formular como soluciones, emulsiones, suspensiones o dispersiones en disolventes o portadores farmacéuticos adecuados, o como píldoras, tabletas, pastillas, supositorios, sobres, grageas, gránulos, polvos, polvos para reconstitución o cápsulas junto con portadores sólidos según los métodos convencionales conocidos en la materia para la preparación de diversas formas de dosificación. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por una vía de administración adecuada, como oral, parenteral, rectal, nasal, tópica o vías oculares, o por inhalación. Preferiblemente, las composiciones son formuladas para administración intravenosa u oral.

Para la administración oral, el compuesto de la invención puede proporcionarse en una forma sólida, como una tableta o cápsula, o como una solución, emulsión o suspensión. Para preparar las composiciones orales, los compuestos de la invención pueden ser formulados para producir una dosificación de, *por ejemplo*, desde alrededor de 0,1 mg a 1 g diario, o alrededor de 1 mg a 50 mg diario, o alrededor de 50 a 250 mg diario, o alrededor de 250 mg a 1 g diario. Las tabletas orales pueden incluir los ingredientes activos mezclados con excipientes compatibles farmacéuticamente aceptables como diluyentes, agentes de desintegración, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Los rellenos inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, lactosa, almidón, azúcar, glucosa, metil celulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los excipientes orales líquidos ejemplares, incluyen etanol, glicerol, agua y similares. El almidón, polivinil-pirrolidona (PVP), glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina y ácido alginico son agentes de desintegración ejemplares. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina. El agente lubricante, si está presente, puede ser estereato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, la tabletas pueden ser recubiertas con un material tal como monoestereato de glicerilo o diestereato de glicerilo para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal, o puede ser recubierta con una cubierta entérica.

Las cápsulas para administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura y blanda. Para preparar las cápsulas de gelatina dura, el ingrediente activo puede ser mezclado con un diluyente sólido, semisólido o líquido. Las cápsulas de gelatina suave se pueden preparar mezclando el ingrediente activo con agua, un aceite, como el aceite de cacahuete o aceite de oliva, parafina líquida, una mezcla de mono y di-glicéridos de ácidos grasos de cadena corta, polietilenglicol 400 y propilenglicol.

Los líquidos para la administración oral pueden ser en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones y jarabes, o puede ser liofilizados o presentados como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Dichos líquidos opcionalmente pueden contener: excipientes farmacéuticamente aceptables como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, alginato de sodio, gelatina, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y similares); vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite (por ejemplo, aceite de almendras o aceite de coco fraccionado), propilenglicol, alcohol etílico o agua; conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico); agentes humectantes como lecitina; y, si lo desea, saborizantes o agentes colorantes.

Para uso parenteral, incluyendo vías intravenosas, intraperitoneal, intranasal o subcutánea, los agentes de la invención pueden proporcionarse en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH apropiado e isotonicidad o en aceite parenteralmente aceptable. Vehículos acuosos adecuados incluyen la solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Dichas formas pueden presentarse en forma de dosis unitaria como ampollas o dispositivos de inyección desechables, en formas de dosis múltiples tales como frascos de los cuales se puede retirar la dosis adecuada, o en una forma sólida o pre-concentrada que puede utilizarse para preparar una formulación inyectable. Las dosis de infusión ilustrativas varían de alrededor de 1 a 1000 µg/kg/minuto de agente mezclado con un portador farmacéutico durante un período que va de varios minutos hasta varios días.

Para la administración nasal, inhalada u oral, las composiciones farmacéuticas inventivas pueden ser administradas usando, por ejemplo, una formulación en aerosol que contiene un portador adecuado. Las composiciones inventivas pueden formularse para la administración rectal como supositorios.

Para las aplicaciones tópicas, el compuesto de la presente invención está preferentemente formulado como cremas o ungüentos o un vehículo similar adecuado para la administración tópica. Para la administración tópica, el compuesto inventivo puede ser mezclado con un portador farmacéutico en una concentración de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 % de fármaco a vehículo. Otro modo de administrar el agente de la invención puede utilizar una formulación de

parches para la administración transdérmica.

Combinaciones de fármaco

5 El compuesto descrito en el presente documento puede utilizarse en composiciones farmacéuticas o métodos en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales en el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento. Ingredientes activos adicionales incluyen otras terapias o agentes que mitigan los efectos adversos de las terapias para los objetivos de enfermedad previstos. Dichas combinaciones pueden servir para aumentar la eficacia, aliviar otros síntomas de enfermedades, disminuir uno o más efectos secundarios, o
10 disminuir la dosis requerida de compuesto inventivo. Los ingredientes activos adicionales se pueden administrar en una composición farmacéutica separada del compuesto de la presente invención o pueden ser incluidos con el compuesto de la presente invención en una sola composición farmacéutica. Los ingredientes activos adicionales pueden ser administrados de manera simultánea con, antes de, o después de la administración del compuesto de la presente invención.

15 Los agentes de combinación incluyen ingredientes activos adicionales que son los conocidos o descubiertos por ser efectivos en tratar las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento, que incluye los activos contra otro objetivo asociado con la enfermedad. Por ejemplo, las composiciones y formulaciones de la invención, así como métodos de tratamiento, pueden comprender además otros fármacos o productos farmacéuticos, por ejemplo, otros
20 agentes activos útiles para el tratamiento o paliativos para las enfermedades objetivo o síntomas o padecimientos relacionados.

Otros agentes quimioterapéuticos adecuados para uso en combinación en los métodos descritos en el presente documento incluyen pero no se limitan a inhibidores de cinasa, adrenocorticoides y corticoesteroides, agentes
25 alquilantes, inhibidores de la transducción de señal peptidomimética, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, aclamicina y derivados de aclamicina, estrógenos, antimetabolitos, compuestos de platino, amanitinas, alcaloides vegetales, mitomicinas, discodermólidas, inhibidores de microtúbulo, epotilones, agentes inflamatorios y proinflamatorios, análogos de purinas, análogos de pirimidina, camptotecinas y dolastatinas. En algunas realizaciones, los agentes quimioterapéuticos adecuados para tratamientos de combinación en los métodos descritos en este
30 documento incluyen, pero no están limitados a, uno o más de afatinib, alectinib, axitinib, bosutinib, brigatini, cabozantinib, ceritinib, crizotinib, dabrefenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, gefitinib, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, nintedanib, palbociclib, pazopanib, ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, sirolimus, sorafenib, sunitinib, tofacitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib, vemurafenib, metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, tamoxifeno, taxol, paclitaxel, docetaxel, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, daunomicina, rizoxina,
35 prednisona, hidroxiurea, tenipósido, vincristina, vinblastina, eribulina, camptotecina, irinotecán, geldanamycin, estramustina y nocodazol. agentes quimioterapéuticos adecuados para tratamientos de combinación en los métodos descritos en este documento incluyen, pero sin limitación a uno o más inhibidores de cinasas seleccionados del grupo que consiste en afatinib, alectinib, axitinib, bosutinib, brigatini, cabozantinib, ceritinib, crizotinib, dabrefenib, dasatinib, erlotinib, everolimus, gefitinib, ibrutinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, nilotinib, nintedanib, palbociclib, pazopanib,
40 ponatinib, regorafenib, ruxolitinib, sirolimus, sorafenib, sunitinib, tofacitinib, temsirolimus, trametinib, vandetanib y vemurafenib. En algunas realizaciones, el paciente ha sido tratado previamente con crizotinib. Para indicaciones de dolor, los agentes de combinación adecuados incluyen antiinflamatorios tales como NSAIDs. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más de dichos agentes activos, y los métodos de tratamiento pueden comprender adicionalmente administrar una cantidad efectiva de uno o más de estos agentes
45 activos.

Pruebas de diagnóstico

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer en un paciente
50 anteriormente identificado como que tiene una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada, tal como una fusión de genes. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad en un paciente que comprende (i) identificar una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada en el paciente y (ii) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto útil en el tratamiento de dicha enfermedad.

55 Se apreciará que el diagnóstico o identificación de un paciente como que tiene una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada puede lograrse por cualquier número de pruebas diagnósticas conocidas para un experto en la materia. Por ejemplo, dichas pruebas de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, hibridación fluorescente in situ (FISH), reacción de cadena de polimerasa (PCR), inmunohistoquímica (IHC), secuenciación de genoma completo,
60 secuenciación de siguiente generación, y similares. También se apreciará que cualquiera de los métodos conocidos en la materia y aplicables al diagnóstico de un paciente o identificación de un paciente en relación con la presente divulgación implican la transformación de una muestra biológica de un estado de la materia a otro por modificación directa, síntesis o conexión directa no covalente para proporcionar una muestra modificada que puede utilizarse para determinar si el sujeto tiene o no tiene una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada. En algunas
65 realizaciones, "diagnosticar" o "identificar" respecto al estado de la enfermedad de un paciente significa aplicar una prueba diagnóstica, tal como FISH, PCR o IHC, a una prueba biológica obtenida del paciente.

Se apreciará que FISH es una prueba que “mapea” el material genético en las células de una persona. Esta prueba puede utilizarse para visualizar genes específicos o porciones de genes. FISH es una técnica citogenética que utiliza sondas fluorescentes que se enlazan sólo a aquellas partes del cromosoma con un alto grado de complementariedad de la secuencia. Dichas pruebas FISH pueden utilizarse para identificar a un paciente con una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada por cualquier método conocido en la materia, y dichas pruebas pueden utilizarse en combinación con los métodos descritos en este documento como cualquier medio de identificación previa de un paciente para tratamiento, o la identificación concomitante de un paciente para el tratamiento.

Se apreciarán que IHC se refiere al proceso de detección de antígenos (p. ej., proteínas) en las células de una sección de tejido explotando el principio de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos en los tejidos biológicos. La tinción inmunohistoquímica es ampliamente utilizada en el diagnóstico de células anormales tales como las encontradas en los tumores cancerígenos. Los marcadores moleculares específicos son característicos de determinados eventos celulares tales como proliferación o muerte celular (apoptosis). Se puede lograr la visualización de una interacción anticuerpo-antígeno en un número de maneras. En el caso más común, un anticuerpo es conjugado a una enzima, tal como peroxidasa, que puede catalizar una reacción productora de color. Alternativamente, el anticuerpo también puede etiquetarse a un fluoróforo, como la fluoresceína o rodamina. Dichas pruebas IHC pueden utilizarse para identificar a un paciente con una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada por cualquier método conocido en la materia, y dichas pruebas pueden utilizarse en combinación con los métodos descritos en este documento como cualquier medio de identificación previa de un paciente para tratamiento, o la identificación concomitante de un paciente para el tratamiento.

Se apreciará que PCR se refiere a una tecnología en la biología molecular utilizada para amplificar una sola copia o algunas copias de un pedazo de ADN a través de varias órdenes de magnitud, generando miles de millones de copias de una secuencia particular de ADN. Dichas pruebas PCR pueden utilizarse para identificar a un paciente con una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada por cualquier método conocido en la materia, y dichas pruebas pueden utilizarse en combinación con los métodos descritos en este documento como cualquier medio de identificación previa de un paciente para tratamiento, o la identificación concomitante de un paciente para el tratamiento.

Se apreciará que toda la secuenciación del genoma o secuenciación de siguiente generación se refiere a un proceso que determina la completa secuencia de ADN de un genoma del organismo en una sola vez. Esto implica la secuenciación todo el ADN cromosómico del organismo, así como el ADN contenido en la mitocondria. Dichas pruebas de genoma completo pueden utilizarse para identificar a un paciente con una tirosina o cinasa serina/treonina genéticamente alterada por cualquier método conocido en la materia, y dichas pruebas pueden utilizarse en combinación con los métodos descritos en este documento como cualquier medio de identificación previa de un paciente para tratamiento, o la identificación concomitante de un paciente para el tratamiento.

Ejemplos

Los ejemplos y preparaciones proporcionadas a continuación ilustran y ejemplifican además aspectos particulares de las realizaciones de la divulgación. Debe entenderse que el alcance de la presente divulgación no está limitada de ninguna manera por el alcance de los siguientes ejemplos.

Los ejemplos 8, 10, 12-13, 15 y 18-19 son meramente ilustrativos.

Abreviaturas

Los ejemplos descritos en el presente documento utilizan materiales, incluyendo pero no limitado a, los descritos por las siguientes abreviaturas conocidas a los expertos en la materia.

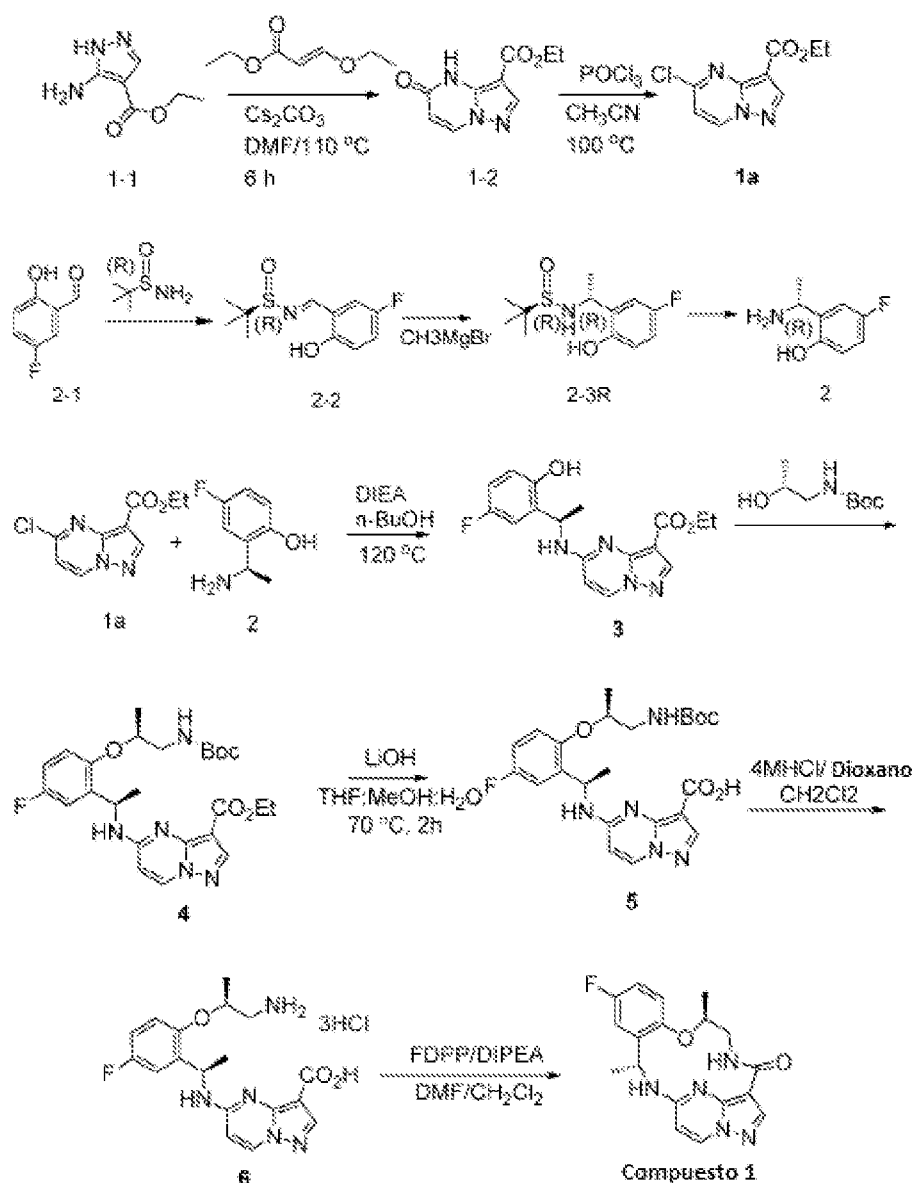
g	gramos
eq	equivalentes
mmol	milimoles
mol	moles
ml	mililitros
l	litros
EtOAc o EA	acetato de etilo
MeCN	acetonitrilo
DCM	diclorometano
DEAD	azodicarboxilato de dietilo
MHz	megahercio

(continuación)

δ	cambio químico
THF	tetrahidrofurano
PE	éter de petróleo
R_f	factor de retraso
DMSO-d6	sulfóxido de dimetilo deuterado
$CDCl_3$	cloroformo deuterado
n-BuOH	n-butanol
DIEA	n,n-diisopropiletilamina
TMSCl	cloruro de trimetilsililo
min	minutos
hrs, hr o h	horas
TLC	cromatografía en capa fina
M	molar
MS	espectro de masa
m/z	proporción de masa a carga
FDPP	pentafluorofenil difenilfosfinato
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	N,N-dimetilformamida

Síntesis del Compuesto 1

- 5 El compuesto 1 se preparó de acuerdo con el siguiente esquema sintético:



Ejemplo 1: Preparación de 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (1a).

5 Paso 1: Preparación de etilo 5-oxo-4H-pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (1-2)

A una mezcla de etilo 5-amino-1H-pirazol-4-carboxilato (Sigma-Aldrich, 150,00 g, 1,08 mmol) y etilo (E)-3-etoxiprop-2-enoato (Sigma-Aldrich, 292,16 g, 2,03 mol) en DMF (3,2 l) se añadió Cs₂CO₃ (656,77 g, 2,02 mol) en una porción a 20 °C bajo N₂. La mezcla se agitó a 110 °C durante 6 hrs. TLC (PE: EtOAc=1: 1) mostro que la reacción estaba finalizada. La mezcla se enfrió a 20 °C y se filtró a través de una almohadilla de celite. La torta del filtro se lavó con acetato de etilo (3X30 ml). El filtrado se añadió a H₂O (2 l) y se acidificó con HOAc a pH=4. El precipitado resultante se filtró para proporcionar 1-2 (173,00 g, 834,98 mmol, 86,36 % de rendimiento) como un sólido blanco: ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,54 (d, J=7,91 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 6,13 (d, J=7,91 Hz, 1H), 4,27 (q, J=7,11 Hz, 2H), 1,28 (t, J=7,09 Hz, 3H).

15 Paso 2: Preparación de 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (1)

A una mezcla de 1-2 (158,00 g, 762,59 mmol) en MeCN (1,6 l) se añadió POCl₃ (584,64 g, 3,81 mol) a 20 °C bajo N₂. La mezcla se agitó a 100 °C durante 2 hrs, TLC (PE: EA=1: 1) mostró que la reacción estaba finalizada. La mezcla se enfrió a 20 °C y se vertió en agua helada (5000 ml) en porciones a 0 °C y se agitó durante 20 min. El precipitado se filtró y se secó para proporcionar 1a (110,00 g, 487,52 mmol, 63,93 % de rendimiento) como un sólido blanco: ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,33 (d, J=7,28 Hz, 1H), 8,66 (s, 1H), 7,41 (d, J=7,15 Hz, 1H), 4,31 (q, J=7,15 Hz, 2H), 1,32 (t, J=7,09 Hz, 3H).

Ejemplo 2: Preparación de (R)-2-(1-aminoetilo)-4-fluorofenol (2).

Paso 1: Preparación de (R)-N-(5-fluoro-2-hidroxibencilideno)-2-metilpropano-2-sulfinamida (2-2)

A una solución de (R)-2-metilpropano-2-sulfinamida (Sigma-Aldrich, 150,00 g, 1,24 mol, 1,00 eq.) y 5-fluoro-2-hidroxibenzaldehído (**2-1**) (Sigma-Aldrich, 173,74 g, 1,24 mol, 1,00 eq.) en DCM (2,00 l) se añadió Cs₂CO₃ (646,43 g, 1,98 mol, 1,60 eq.). La mezcla se agitó a 16 °C durante 16 horas, TLC (PE:EtOAc=5:1) mostró que la reacción estaba finalizada. La mezcla de reacción se mitigó por la adición de H₂O (1000 ml) at 0 °C y luego se extrajo con EtOAc (500 mlx4). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1000 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar **2-2** (230,00 g, 945,33 mmol, 76,24 % de rendimiento), ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,64 (s, 1H), 7,22 - 7,11 (m, 2H), 7,03 - 6,95 (m, 1H), 1,28 (s, 9H).

Paso 2: Preparación de (R)-N-((R)-1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etilo)-2-metilpropano-2-sulfinamida (2-3R)

A una solución de (R)-N-(5-fluoro-2-hidroxibencilideno)-2-metilpropano-2-sulfinamida (**2-2**) (200,00 g, 822,03 mmol, 1,00 eq.) en THF (2,5 l) se añadió MeMgBr (490,09 g, 4,11 mol, 5,00 eq.) por goteo a -65 °C bajo N₂ sobre un periodo de 30 min. La mezcla después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. TLC (PE:EtOAc=1:1) mostró que la reacción estaba finalizada con la producción de dos diastereómeros. La mezcla de reacción se mitigó por la adición de H₂O (2 l) a 0 °C, la mezcla se extrajo con EtOAc (500 mlx3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (500 ml), y se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=50/1 a 1:1) para dar (R)-N-((R)-1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etilo)-2-metilpropano-2-sulfinamida (**2-3R**) (125 g, la parte superior, menos el punto polar con Rf: 0,5, PE: EA=1:1). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 9,17 (s, 1H), 6,68 (dd, J=3,0, 8,8 Hz, 1H), 6,47 (dt, J=3,0, 8,4 Hz, 1H), 6,31 (dd, J=4,8, 8,8 Hz, 1H), 5,11 (d, J=8,0 Hz, 1H), 4,28 (quin, J=7,2 Hz, 1H), 1,43 (d, J=6,8 Hz, 3H), 1,20 (s, 9H).

Paso 3: Preparación de (R)-2-(1-aminoetilo)-4-fluorofenol (2)

Una solución de (R)-N-((R)-1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etilo)-2-metilpropano-2-sulfinamida (**2-3R**) (125 g, 481,99 mmol, 1,00 eq.) en HCl/dioxano (1,5 l, 4N) se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. TLC (PE:EtOAc=2:1) mostró que la reacción estaba finalizada. La mezcla se filtró para dar (R)-2-(1-aminoetilo)-4-fluorofenol (**2**) sal de HCl (85 g, 443,56 mmol, 90,03 % de rendimiento) como un sólido blanco. ¹H RMN (d-DMSO, 400 MHz) δ 10,24 (s, 1H), 8,48 (br, s, 3H), 7,31 (dd, J=2,9, 9,7 Hz, 1H), 7,05 - 6,99 (m, 1H), 6,98 - 6,93 (m, 1H), 4,59 - 4,45 (m, 1H), 1,46 (d, J=6,8 Hz, 3H).

Ejemplo 3: Preparación de (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazaciotridecin-4(5H)-ona (Compuesto 1).

Paso 1: Preparación de etilo (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (3)

A una solución de (R)-2-(1-aminoetilo)-4-fluorofenol (**2**) (85 g, 443,56 mmol, 1,00 eq.) y etilo 5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (**1a**) (100,08 g, 443,56 mmol, 1,00 eq.) en n-BuOH (2 l) se añadió DIEA (343,96 g, 2,66 mol, 6,00 eq.). La mezcla se agitó a 120 °C durante 2 hrs. TLC (PE:EtOAc=1:1) mostró que la reacción estaba finalizada. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (500 ml) a 16 °C, y se extrajo con EtOAc (500 mlx3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (500 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo=10/1 a 1:3) para dar etilo (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (**3**) (122 g, 349,34 mmol, 78,76 % de rendimiento, ee>99 % de pureza) como un sólido blanco. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 9,28 (br, s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,14 (d, J=7,5 Hz, 1H), 6,95 - 6,89 (m, 2H), 6,87 - 6,80 (m, 1H), 6,18 (d, J=7,5 Hz, 1H), 5,98 (d, J=8,3 Hz, 1H), 5,71 - 5,54 (m, 1H), 4,50 - 4,35 (m, 2H), 1,60 (d, J=6,8 Hz, 3H), 1,42 (t, J=7,2 Hz, 3H).

Paso 2: Preparación de etilo 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((tert)-butoxicarbonilo)amino)propan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (4)

Una mezcla de etilo (R)-5-((1-(5-fluoro-2-hidroxifenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (**3**) (10,00 g, 29,04 mmol) y tert-butilo (R)-2-hidroxipropilcarbamat (Combi-Bloques, 7,63 g, 43,56 mmol) fue un azeótropo secado de DCM/tolueno, y después se volvió a disolver en DCM (11,62 ml). A la solución se añadió PPh₃ (11,43 g, 43,56 mmol), y la mezcla se agitó hasta que los materiales de inicio estaban completamente disueltos. A la solución se añadió DEAD (8,81 g, 43,56 mmol) más de 5 min con mezclado. La reacción se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (125 ml), seguido de la adición de una solución acuosa de NaOH (2M, 100 ml). La mezcla se agitó vigorosamente durante 12 horas y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo además con DCM (3 x 50 ml). Los extractos combinados se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron con Na₂SO₄, y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó con cromatografía flash (sistema Teledyne ISCO, sílice (330 g), 0-40 % acetato de etilo en hexano para proporcionar etilo 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((tert)-butoxicarbonilo)amino)propan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxilato (**4**) (8,88 g,

60,9 % de rendimiento). LC-MS m/z 502,2 (M+H)⁺. ¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ 8,24 (s, 1H), 8,21 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J=6,0$ Hz, 2H), 6,13 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 5,91 (br, s, 1H), 4,58 (d, $J=3,6$ Hz, 1H), 4,43 - 4,28 (m, 2H), 3,52 - 3,34 (m, 2H), 1,54 (d, $J=6,8$ Hz, 3H), 1,47 - 1,36 (m, 12H), 1,30 (d, $J=6,4$ Hz, 3H).

5 Paso 3: Preparación de ácido 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((*tert*-butoxicarbonilo)amino)propan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carboxílico (5)

10 A una solución de etilo 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((*tert*-butoxicarbonilo)amino)propan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carboxilato (**4**) (6,98 g, 13,92 mmol, 1 eq.) en metanol (65 ml) y THF (20 ml) se añadió LiOH (2M, 47,9 ml, 95,8 mmol). La mezcla se calentó a 70 °C durante 3 hrs, se enfrió a temperatura ambiente, y luego se mitigó con HCl ac. (2M, 95,8 ml) para ajustar el pH<5. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3X50 ml), y se secó sobre Na₂SO₄. Después de la filtración, evaporación y secado al alto vacío, se obtuvo un sólido blanco de ácido 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((*tert*-butoxicarbonilo)amino)propan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carboxílico (**5**) se obtuvo el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional. LC-MS m/z 474,2 (M+H)⁺.

Paso 4: Preparación de ácido 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-aminopropan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carboxílico (6)

20 A una solución de ácido 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-((*tert*-butoxicarbonilo)amino)propan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carboxílico (**5**) (6,59 g, 13,92 mmol) en CH₂Cl₂ (130 ml) se añadió HCl en dioxano (4 M, 30,4 ml). Se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que la reacción mostró estar finalizada por LC-MS. La mezcla de reacción se concentró, y se secó al alto vacío para proporcionar el Compuesto **6** como un sólido blanco el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional. LC-MS m/z 374,2 (M+H)⁺.

Paso 5: Preparación de (7*S*,13*R*)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-*f*][1,4,8,10]benzoxatriazaciotridecin-4(5*H*)-ona (Compuesto 1).

30 Ácido 5-(((R)-1-(2-(((S)-1-aminopropan-2-il)oxi)-5-fluorofenil)etilo)amino)pirazolo[1,5-*a*]pirimidina-3-carboxílico (**6**) (5,20 g, 13,93 mmol) se disolvió en DMF (75 ml) para hacer la solución A. A una solución de base de Hunig (DIPEA) (14,40 g, 111,4 mmol) en DMF (150 ml) y DCM (350 ml) se añadió la solución A (25 ml) y un tercio del FDPP total (5,62 g, 14,63 mmol) secuencialmente. La reacción se agitó durante 1 hora, y LC-MS mostro la finalización de la reacción de acoplamiento. El mismo proceso se repitió por 2 veces más. La solución final se agitó a temperatura ambiente durante 63 horas (o hasta que la reacción mostró estar finalizada por LC-MS). La reacción se mitigó por la adición de solución acuosa de Na₂CO₃ (2M, 150 ml), y la mezcla se agitó durante 15 min, y se extrajo con DCM (3 x 150 ml). Los extractos combinados se secaron con Na₂SO₄, se concentró bajo presión reducida, y se purificó en una cromatografía flash (sistema Teledyne ISCO, sílice (220 g), 0-7,5 % de metanol en diclorometano) para proporcionar (7*S*,13*R*)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahidro-1,15-etenopirazolo[4,3-*f*][1,4,8,10]benzoxatriazaciotridecin-4(5*H*)-ona (**Compuesto 1**) (4,38 g, 12,33 mmol, 88,5 % de rendimiento) como un sólido blanco. LC-MS: m/z [M+H]⁺ 356,2. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,82 (dd, $J=8,02$, 2,29 Hz, 1 H), 8,81 (d, $J=6,87$ Hz, 1 H), 8,58 (d, $J=7,45$ Hz, 1 H), 8,04 (s, 1 H), 7,12 (dd, $J=9,45$, 3,15 Hz, 1 H), 6,99 - 7,05 (m, 1 H), 6,94 - 6,99 (m, 1 H), 6,36 (d, $J=7,45$ Hz, 1 H), 5,53 (m, 1 H), 4,45 - 4,52 (m, 1 H), 3,90 (ddd, $J=13,46$, 8,31, 4,01 Hz, 1 H), 3,10 - 3,17 (m, 1 H), 1,46 (d, $J=6,30$ Hz, 3 H), 1,44 (d, $J=7,45$ Hz, 3 H).

Ensayos *in vitro*

Materiales y Métodos

50 Método de ensayo de enlace a cinasa

Los ensayos de enlace a cinasa se realizaron en DiscoverX usando el protocolo general de KINOMEscan K_d (Fabian, M. A. *et al.*, "A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors," Nat. Biotechnol. 2005, 23(3):329-36). Para la mayoría de los ensayos, la cepas de fago T7 etiquetadas con cinasa se prepararon en un hospedero *E. coli* que se derivada de la cepa BL21. Se cultivó *E. coli* para la fase logarítmica y se infectó con fago T7 y se incubó con agitación a 32 °C hasta la lisis. Los lisados fueron centrifugados y filtrados para eliminar los restos celulares. Las cinasas restantes fueron producidas en las células HEK-293 y posteriormente etiquetadas con ADN para la detección de qPCR. Las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina fueron tratadas con ligandos de molécula pequeña biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para los ensayos de cinasa. Las perlas con ligandos fueron bloqueadas con exceso de biotina y lavadas con tampón de bloqueo (SeaBlock (Pierce), 1 % de BSA, 0,05 % de Tween 20, 1 mM de DTT) para retirar los ligandos no unidos y para reducir la unión no específica. Las reacciones de unión se montaron por la combinación de cinasas, ligando perlas de afinidad, y compuestos de prueba en 1x de tampón de unión (20 % de SeaBlock, 0,17x de PBS, 0,05 % de Tween 20, 6 mM de DTT). Todas las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 pocillos en un volumen final de 0,135 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y las perlas de afinidad se lavaron con tampón de lavado (1x de PBS, 0,05 % de Tween 20). Las perlas después se volvieron a suspender en

tampón de elución (1x de PBS, 0,05 % de Tween 20, 0,5 µM de ligando de afinidad no biotinilado) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. Se midió la concentración de cinasa en los eluatos por qPCR.

Las constantes de unión (K_d s) se calcularon con una curva estándar de respuesta a la dosis usando la ecuación de Hill:

$$\text{Respuesta} = \text{Fondo} + (\text{señal} - \text{Fondo}) / (1 + (K_d^{\text{Pendiente de Hill}} / \text{Dosis}^{\text{Pendiente de Hill}}))$$

La pendiente de Hill se establece en -1. Las curvas se ajustaron usando un ajuste mínimo cuadrado no lineal con el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Método de ensayo de cinasa bioquímica

El ensayo de cinasa bioquímica se realizó en la Reaction Biology Corporation (www.reactionbiology.com, Malvern, PA) siguiendo los procedimientos descritos en la referencia (Anastassiadis T, et al *Nat Biotechnol.* 2011, 29, 1039). Pares de cinasa/substrato específico junto con los cofactores requeridos fueron preparados en el tampón de reacción; 20 mM de Hepes pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, 0,02 % de Brij35, 0,02 mg/ml de BSA, 0,1 mM de Na₃VO₄, 2 mM de DTT, 1 % de DMSO (para detalles específicos de componentes de reacción de cinasa ver Tabla Complementaria 2). Los compuestos se suministraron en la reacción, después de ~ 20 minutos después de la adición de una mezcla de ATP (Sigma, St. Louis MO) y ³³P ATP (Perkin Elmer, Waltham MA) a una concentración de 10 µM. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 120 min, tras depositar las muestras de las reacciones sobre el papel de filtro de intercambio de iones P81 (Whatman Inc., Piscataway, NJ). El fosfato no enlazado se retiró por un extenso lavado de filtros en 0,75 % de ácido fosfórico. Después de la sustracción del fondo derivado de las reacciones de control que contienen la enzima inactiva, los datos de actividad de la cinasa se expresaron como el porcentaje restante de la actividad de la cinasa en muestras de prueba en comparación con las reacciones del vehículo (dimetilsulfóxido). Los valores de IC₅₀ y los ajustes de la curva se obtuvieron usaron Prism (GraphPad Software).

Líneas celulares y cultivo de células:

La línea celular de pulmón humano NCI-H2228 se obtuvo de ATCC. Las líneas celulares 293T, NIH3T3, Ba/F3, y HCC78 se compraron de DSMZ. La línea celular Karpas-299 fue adquirida de Sigma. La línea celular KM12 se obtuvo de NCI.

NIH3T3 fue mantenida en medio DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. HCC78, Karpas-299 y H2228 se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal con 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células Ba/F3 se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 10 % (vol/vol) de medios condicionados de las células secretoras de IL-3 mielomonocíticas WIHI-3B y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las líneas celulares estables BaF3 se mantuvieron en RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 0,5 µg/ml de solución de puomicina.

Clonación y creación de la línea celular estable Ba/F3 o NIH3T3

El gen EML4-CLA (variante 1) se sintetizó en GenScript y se clonó en plásmido pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc). En EML4-CLA se generaron las mutaciones puntuales G1202R, L1196M, L1152P, F1174C, C1156Y, I1171N, G1269S, e inserción de 1151T en GenScript por PCR y se confirmó por secuenciación. Ba/F3-EML4-CLA de tipo silvestre y los mutantes se generaron por la transducción de las células Ba/F3 con lentivirus que contiene EML4-CLA de tipo silvestre o mutantes. Líneas celulares estables fueron seleccionadas por tratamiento de puomicina, seguido por el retiro de IL-3. Brevemente, 5X10⁶ Ba/F3 células fueron transducidas con un sobrenadante de lentivirus en la presencia de 8 µg/ml de sulfato de protamina. Las células transducidas fueron posteriormente seleccionadas con 1 µg/ml de puomicina en la presencia de RPMI1640 medio que contiene IL3, más 10 % de FBS. Después de 10-12 días de selección, las células sobrevivientes fueron seleccionadas además para el crecimiento independiente de IL3.

SDC4-ROS1 de tipo silvestre, CD74-ROS1 de tipo silvestre, y sus genes mutantes G2032R fueron sintetizados en GenScript y clonados en el plásmido pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc), y confirmado por secuenciación. Ba/F3 SDC4-ROS1, ROS1 CD74 y los mutantes G2032R correspondientes fueron generados por transducción de células Ba/F3 con lentivirus que contiene los genes de fusión. Líneas celulares estables fueron seleccionadas por tratamiento de puomicina, seguido por el retiro de IL-3. Brevemente, 5X10⁶ Ba/F3 células fueron transducidas con un sobrenadante de lentivirus en la presencia de 8 µg/ml de sulfato de protamina. Las células transducidas fueron posteriormente seleccionadas con 1 µg/ml de puomicina en la presencia de RPMI1640 medio que contiene IL3, más 10 % de FBS. Después de 10-12 días de selección, las células sobrevivientes fueron seleccionadas además para el crecimiento independiente de IL3.

Las líneas celulares Ba/F3 TPR-CLA y Ba/F3 TPR-CLA fueron creadas en Advanced Cellular Dynamics, Inc. y los ensayos de proliferación celular se realizaron ahí. El mismo panel de ACD se compone de 92 cinasas únicas individualmente expresadas en una línea celular linfocítica común (células de ratón Ba/F3). Cada línea celular es

dependiente de la actividad de la cinasa recombinante para la sobrevivencia.

Los genes mutantes SDC4-ROS1 L2026M y D2033N fueron sintetizados en GenScript y clonados en el plásmido pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc), y confirmado por secuenciación. Los mutantes Ba/F3 CD74-ROS1 L2026M y D2033N fueron generados por transducción de células Ba/F3 con lentivirus que contiene los genes de fusión. Líneas celulares estables fueron seleccionadas por tratamiento de puomicina, seguido por el retiro de IL-3. Brevemente, 5×10^6 Ba/F3 células fueron transducidas con un sobrenadante de lentivirus en la presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de protamina. Las células transducidas fueron posteriormente seleccionadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina en la presencia de RPMI1640 medio que contiene IL3, más 10 % de FBS. Después de 10-12 días de selección, las células sobrevivientes fueron seleccionadas además para el crecimiento independiente de IL3.

LMNA-TRKA de tipo silvestre, y sus genes mutantes G595R fueron sintetizados en GenScript y clonados en el plásmido pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc), y confirmado por secuenciación. Ba/F3 LMNA-TRKA y el mutante G595R correspondiente fueron generados por transducción de células Ba/F3 con lentivirus que contiene los genes de fusión. Líneas celulares estables fueron seleccionadas por tratamiento de puomicina, seguido por el retiro de IL-3. Brevemente, 5×10^6 Ba/F3 células fueron transducidas con un sobrenadante de lentivirus en la presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de protamina. Las células transducidas fueron posteriormente seleccionadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina en la presencia de RPMI1640 medio que contiene IL3, más 10 % de FBS. Después de 10-12 días de selección, las células sobrevivientes fueron seleccionadas además para el crecimiento independiente de IL3.

TEL-TRKB (también nombrado como ETV6-TRKB) de tipo silvestre, y sus genes mutantes G639R fueron sintetizados en GenScript y clonados en el plásmido pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc), y confirmado por secuenciación. Ba/F3 TEL-TRKB y el mutante G639R correspondiente fueron generados por transducción de células Ba/F3 con lentivirus que contiene los genes de fusión. Líneas celulares estables fueron seleccionadas por tratamiento de puomicina, seguido por el retiro de IL-3. Brevemente, 5×10^6 Ba/F3 células fueron transducidas con un sobrenadante de lentivirus en la presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de protamina. Las células transducidas fueron posteriormente seleccionadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina en la presencia de RPMI1640 medio que contiene IL3, más 10 % de FBS. Después de 10-12 días de selección, las células sobrevivientes fueron seleccionadas además para el crecimiento independiente de IL3.

TEL-TRKC (también nombrado como ETV6-TRKC) de tipo silvestre, y sus genes mutantes G623R fueron sintetizados en GenScript y clonados en el plásmido pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc), y confirmado por secuenciación. Ba/F3 TEL-TRKC y el mutante G623R correspondiente fueron generados por transducción de células Ba/F3 con lentivirus que contiene los genes de fusión. Líneas celulares estables fueron seleccionadas por tratamiento de puomicina, seguido por el retiro de IL-3. Brevemente, 5×10^6 Ba/F3 células fueron transducidas con un sobrenadante de lentivirus en la presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de protamina. Las células transducidas fueron posteriormente seleccionadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina en la presencia de RPMI1640 medio que contiene IL3, más 10 % de FBS. Después de 10-12 días de selección, las células sobrevivientes fueron seleccionadas además para el crecimiento independiente de IL3.

Las líneas celulares estables NIH3T3 CLA o ROS1 fueron generadas por la transducción de las células con lentivirus que contiene EML4-CLA de tipo silvestre y los genes mutantes G1202R, SDC4-ROS1 tipo silvestre, CD74-ROS1 tipo silvestre y su gen mutante G2032R. Posteriormente se seleccionaron las células transducidas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina.

Las líneas celulares estables NIH3T3 ROS1, o TRKA, o TRKB y TRKC se generaron por la transducción de las células con lentivirus que contienen los genes mutantes CD74 ROS1 L2026M y D2033N, LMNA TRKA de tipo silvestre y genes mutantes G595R, TEL-TRKB de tipo silvestre y los genes mutantes G639R, TEL-TRKB de tipo silvestre y genes mutantes G623R, respectivamente. Posteriormente se seleccionaron las células transducidas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puomicina.

Ensayos de proliferación celular:

Se cultivaron dos mil células por pocillo en una placa blanca de 384 pocillo durante 24 horas, y luego se trataron con compuestos durante 72 horas (37 °C, 5 % de CO₂). La proliferación celular se midió usando el ensayo de detección de ATP basado en luciferasa de CellTiter-Glo (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Las determinaciones de IC₅₀ se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

El ensayo de proliferación celular de líneas celulares Ba/F3 TPR-CLA y Ba/F3 TPR-CLA L1196M se realizaron en Advanced Cellular Dynamics, Inc. La inhibición de la actividad cinasa conduce a la muerte celular, que es monitoreada a través de la concentración de ATP utilizando CellTiter-Glo (Promega). Las líneas celulares se mantuvieron en un medio de cultivo RPMI-1640 que contiene 10 % de suero de ternero fetal y antibióticos. Las células en crecimiento de fase logarítmica se cosecharon y 5.000 células se distribuyeron en cada pocillo de una placa de 384 pocillos en 50 μl de medio de crecimiento. Las células parentales (solamente) fueron cultivadas en la presencia de 10 ng/ml de IL3 para apoyar el crecimiento celular y sobrevivencia. Cincuenta nanolitros de compuesto diluido fueron agregados a los pocillos adecuados, en duplicado, y las células fueron cultivadas durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂.

humidificada al 5 %. Se determinó la viabilidad al añadir 15 µl en CellTiter-Glo y medir la luminiscencia, que se reportó como unidades de luz relativas (RLU, por sus siglas en inglés) medidas en los conteos por segundo.

Western blot para los ensayos de fosforilación de cinasa celular

La línea celular de NSCLC H2228 (que alberga el fusión de gen EML4-CLA endógeno), las células HCC78 (que alberga el gen de fusión SLC34A2-ROS1 endógeno), las células Karpas-299 (que alberga el gen de fusión NPM-CLA endógeno) o SET-2 (que alberga la mutación de activación JAK2V617F endógeno) fueron cultivados en medio RPMI y la línea celular KM12 (que alberga el gen de fusión TPM3-TRKA endógeno) fue cultivada en medio DMEM, ambos suplementados con 10 % de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células Ba/F3 y NIH3T3 que expresan de manera estable CLA o ROS1 (WT o mutante) fueron cultivadas como se mencionó anteriormente. Se cultivaron la mitad de un millón de células por pocillo en una placa de 24 pocillos durante 24 horas, y luego se trataron con compuestos durante 4 horas. Las células fueron recolectadas después del tratamiento y lisadas en tampón RIPA (50 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 % de NP-40, 0,5 % de desoxicolato, 0,1 % de SDS) suplementado con 10 mM de EDTA, 1X de inhibidores de la proteasa Halt y fosfatasa (Thermo Scientific). Los lisados de proteína (aproximadamente 20 µg) fueron resueltos en 4 – 12 % de geles prefabricados Bolt Bis-Tris con tampón de ejecución MES (Life Technologies), transferidos a membranas de nitrocelulosa usando el sistema de transferencia turbo Trans-Blot (Bio-Rad) y detectados con anticuerpos dirigidos a CLA Y1604 fosforilado (Cell Signaling Technology), CLA total (Cell Signaling Technology), ROS1 fosforilado y ROS1 total (Cell Signaling Technology), TRK A/B fosforilado (Cell Signaling Technology), anticuerpo de TRKA total (Santa Cruz Biotechnology), STAT3 fosforilado y STAT5, STAT3 total y STAT5 (Cell Signaling Technology), AKT fosforilado (Cell Signaling Technology), ERK fosforilado (Cell Signaling Technology), AKT total (Cell Signaling Technology), ERK total (Cell Signaling Technology) y Tubulina (Sigma). Los anticuerpos por lo general se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación suave, seguido de lavados e incubación con los anticuerpos adecuados secundarios conjugados por HRP. Las membranas fueron incubadas con sustrato quimioluminiscente por 5 min a temperatura ambiente (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific). Se adquirieron las imágenes de quimioluminiscentes con un sistema de formación de imágenes C-DiGit (LI-COR Biosciences). La densidad relativa de las bandas quimioluminiscentes se cuantificaron mediante Image Studio Digits de LICOR. La mitad del valor (IC₅₀) de la concentración inhibidora se calculó usando un análisis de regresión no lineal a través de GraphPad Prism software (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

La línea celular de NSCLC H2228 (que alberga el gen de fusión EML4-CLA endógeno) fue cultivada en medio RPMI suplementado con 10 % de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células Ba/F3 y NIH3T3 que expresan de manera estable ROS1, o TRKA, o TRKB, o TRKC (WT o mutante) fueron cultivadas como se mencionó anteriormente. Se cultivaron la mitad de un millón de células por pocillo en una placa de 24 pocillos durante 24 horas, y luego se trataron con compuestos durante 4 horas. Las células fueron recolectadas después del tratamiento y lisadas en tampón RIPA (50 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 % de NP-40, 0,5 % de desoxicolato, 0,1 % de SDS) suplementado con 10 mM de EDTA, 1X de inhibidores de la proteasa Halt y fosfatasa (Thermo Scientific). Los lisados de proteína (aproximadamente 20 µg) fueron resueltos en 4 – 12 % de geles prefabricados Bolt Bis-Tris con tampón de ejecución MES (Life Technologies), transferidos a membranas de nitrocelulosa usando el sistema de transferencia turbo Trans-Blot (Bio-Rad) y detectados con anticuerpos dirigidos a ROS1 fosforilado y ROS1 total (Cell Signaling Technology), TRK A/B fosforilado (Cell Signaling Technology), anticuerpo de TRKA total (Santa Cruz Biotechnology), SRC Y416 fosforilado (Cell Signaling Technology), SRC total (Cell Signaling Technology), FAK Y576/577 fosforilado (Cell Signaling Technology), FAK total (Cell Signaling Technology), Y118 paxilina fosforilada (Cell Signaling Technology), paxilina total (Cell Signaling Technology), EGFR fosforilado y EGFR total, CD44, y Tubulina (Sigma). Los anticuerpos por lo general se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación suave, seguido de lavados e incubación con los anticuerpos adecuados secundarios conjugados por HRP. Las membranas fueron incubadas con sustrato quimioluminiscente por 5 min a temperatura ambiente (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific). Se adquirieron las imágenes de quimioluminiscentes con un sistema de formación de imágenes C-DiGit (LI-COR Biosciences). La densidad relativa de las bandas quimioluminiscentes se cuantificaron mediante Image Studio Digits de LICOR. La mitad del valor (IC₅₀) de la concentración inhibidora se calculó usando un análisis de regresión no lineal a través de GraphPad Prism software (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

Ensayos de actividad de apoptosis/caspasa

Las células Karpas-299 fueron mantenidas en medio RPMI suplementado con antibióticos y 10 % de suero bovino fetal. Quinientas mil células por pocillo fueron cultivadas en una placa de 12 pocillos y varias concentraciones de compuestos se introdujeron e incubaron durante 48 horas. Las células después fueron recolectadas y lisadas en un tampón de lisis (20 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 5 mM de EDTA, 1 % de NP40) suplementado con inhibidores de la proteasa Halt y fosfatasa (Thermo Scientific). Para los ensayos de caspasa, aproximadamente 20 µg de lisado celular se incubaron con 20 µl del reactivo de caspasa-3 glo (Promega), y la actividad enzimática se midió por la liberación de luminiscencia después de 20 min de incubación a 37 °C. Para la realización de western blot, el lisado celular se hirvió y analizó por SDS-PAGE/western blot usando anti-caspasa-3 (Cell Signaling Technology), anti-PARP (Cell Signaling Technology) o anticuerpos anti-actina (Cell Signaling Technology). Los anticuerpos por lo general se incubaron toda la noche a 4 °C con agitación suave, seguido de lavados e incubación con los anticuerpos adecuados secundarios conjugados por HRP. Las membranas fueron incubadas con sustrato quimioluminiscente por 5 min a temperatura ambiente (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific), y se obtuvieron las imágenes de

quimioluminiscencia con un sistema de formación de imágenes de C-DiGit (LI-COR Biosciences).

Ensayo de cicatrización de heridas

- 5 Las células HT1080 o HCC78 en un medio RPMI suplementado con antibióticos y 10 % de suero bovino fetal fueron cultivadas en una placa de 24 pocillos. Después de 12 a 24 horas, las monocapas celulares confluentes se raspó suavemente con la punta de una pipeta estéril para formar una herida. Las placas fueron lavadas con medio fresco, y las células se incubaron con medio solo o medio que contiene diferentes concentraciones de compuestos. Después de 12 a 24 horas, las placas fueron examinadas y registradas por un microscopio de EVOS FL (Life Technology) para supervisar el cierre de la monocapa celular.

Métodos *in Vivo*

Líneas celulares

- 15 Las líneas celulares fueron cultivadas utilizando técnicas estándar en medio DMEM o RPMI-1640 (Corning, Inc) con 10 % de suero bovino fetal (Thermo Fisher Scientific, Inc) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Para la implementación, las células fueron cosechadas y formadas en píldoras por centrifugación a 250 g durante 2 minutos. Las células fueron lavadas una vez y se resuspendieron en un medio libre de suero, con 50 % de matrigel (v/v) según sea necesario.

Modelos de xenoinjerto subcutáneo en ratones inmunocomprometidos

- 25 Los ratones atímicos desnudos femeninos y ratones SCID/Beige (5-8 semanas de edad) fueron obtenidos de Charles River Laboratory y fueron alojados en jaulas desechables de Innovive IVC en estantes ventilados filtrados con HEPA con acceso libre a la comida y agua del roedor. Cinco millones de células en 100 µl de medio libre de suero fueron implantados subcutáneamente en la región del flanco derecho del ratón. Las células Karpas299 se implantaron en los ratones SCID/Beige. Las células KM12, las células mutantes NIH3T3 EML4-CLA de tipo silvestre y las células mutantes NIH3T3 SCD4-ROS1 de tipo silvestre fueron implantadas en el ratón atímico desnudo, respectivamente.
- 30 Todos los modelos excepto KM12 fueron implantados con 50 % de matrigel (Corning, Inc.) en el medio. Se midieron el tamaño del tumor y peso corporal en los días asignados. El tamaño del tumor se midió con un calibrador electrónico y el volumen del tumor se calculó como el producto de la longitud * anchura² * 0,5. Los ratones fueron asignados al azar por el tamaño del tumor en los grupos de tratamiento cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 100-200 mm³ y se administró el Compuesto 1 por vía oral (dos veces al día) a determinadas dosificaciones.

- 35 Los ratones atímicos desnudos femeninos y ratones SCID/Beige (5-8 semanas de edad) fueron obtenidos de Charles River Laboratory y fueron alojados en jaulas desechables de Innovive IVC en estantes ventilados filtrados con HEPA con acceso libre a la comida y agua del roedor. Cinco millones de células en 100 µl de medio libre de suero fueron implantados subcutáneamente en la región del flanco derecho del ratón. Ba/F3 EML4-CLA de tipo silvestre y las células mutantes G1202R, Ba/F3 CD74-ROS1 de tipo silvestre y las células mutantes G2032R fueron implantadas en los ratones SCID/Beige. Las células mutantes NIH3T3 CD74 ROS1 G2032, NIH3T3 LMNA-TRKA de tipo silvestre y las células mutantes G595R fueron implantadas en el ratón atímico desnudo, respectivamente. Todos los modelos fueron implantados con 50 % de matrigel (Corning, Inc.) en el medio. Se midieron el tamaño del tumor y peso corporal en los días asignados. El tamaño del tumor se midió con un calibrador electrónico y el volumen del tumor se calculó como el producto de la longitud * anchura² * 0,5. Los ratones fueron asignados al azar por el tamaño del tumor en los grupos de tratamiento cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 100-200 mm³ y se administró el Compuesto 1 por vía oral (dos veces al día) a determinadas dosificaciones.

Procesamiento del tumor y realización de Western blot para estudios farmacodinámicos *in vivo*

- 50 Los ratones que portan los tumores de xenoinjerto fueron sacrificados humanitariamente y los tumores fueron resecados y congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se procesaron las muestras tumorales congeladas a 4 °C en 1x de tampón de lisis celular (Cell Signaling Technologies) para extraer las proteínas. Las muestras de carga SDS se prepararon mediante la adición de un volumen de 4x de tampón de muestra LDS (Life Technologies, Inc) a los tres volúmenes de lisado de proteínas. Las muestras de proteína SDS de tumor fueron procesadas por SDS-PAGE e inmunotransferidas con CLA antifosforilado de conejo y anticuerpos anti-actina de ratón (Cell Signaling Technologies). Las señales del Western blot fueron detectadas por escáner de transferencia C-DiGit de LI-COR y la intensidad de la señal se cuantificaron utilizando el software Image Studio Digit (LI-COR).

Datos y resultados:

Ejemplo 4a: Afinidades de enlace de cinasa y actividades de cinasa enzimáticas del Compuesto 1.

- 65 La afinidad de enlace de la cinasa del Compuesto 1 fue seleccionada en DiscoveRx en un grupo de 460 cinasas seguido por la determinación de K_d para los resultados. El compuesto 1 demostró afinidades de enlace fuertes con ALK, ROS1, TRKA/B/C, JAK2, SRC, FAK y ARK5 (Tabla 1). Además, las actividades de inhibición de cinasa

enzimática del Compuesto 1 en concentración de 10 μ M de ATP se determinó en Reaction Biology, y los resultados del IC₅₀ se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1

Objetivo	CLA	ROS1	TRKA	TRKB	TRKC	JAK2	SRC	FAK	ARK5
<i>K_d</i> (nM)	5,7	0,19	0,019	0,054	0,088	0,082	12,0	27	3,7
IC ₅₀ (nM)	1,04	0,0706	0,826	0,0517	0,0956	1,04	5,29	6,96	4,46

5

Ejemplo 4b: Actividades de la cinasa enzimática del Compuesto 1

La afinidad de enlace de la cinasa del Compuesto 1 fue seleccionada en DiscoverX en un grupo de 460 cinasas. Los resultados de la cinasa del compuesto 1 fueron utilizados además en el ensayo de inhibición de cinasa enzimática recombinada usando una concentración de 10 μ M de ATP en Reaction Biology, y los resultados de IC₅₀ fueron resumidos en la Tabla 1b.

10

Tabla 1b.

Objetivo	IC ₅₀ (nM) en 10 μ M de ATP	Objetivo	IC ₅₀ (nM) en 10 μ M de ATP	Objetivo	IC ₅₀ (nM) en 10 μ M de ATP
TRKB	0,05	SNARK	13,0	JAK3	50
ROS1	0,07	HCK	16,4	EPHA8	50,2
TRKC	0,1	IRR	18,1	IGFR	111
TRKA	0,83	LCK	18,6	PLK4	126
CLA	1,04	JAK1	19	AXL	149
JAK2	1,04	TYK2	21,6	MARK3	512
FYN	1,05	LTK	21,8		
LYN	1,66	DDR2	23		
YES	2,15	BTK	23,7		
FGR	3,05	TNK2	24,1		
TXK	3,17	EPHA1	25,0		
ARK5	4,46	BLK	32,3		
SRC	5,3	GRK7	35,2		
DDR1	5,7	PYK2	39,9		
FAK	6,96	RET	47,1		

15 Ejemplo 5: Evaluación de la actividad del Compuesto 1 contra un grupo de mutaciones de CLA.

Se evaluó el Compuesto 1 contra las mutaciones de resistencia de CLA en los ensayos de cinasa enzimática con una concentración de 10 μ M de ATP en Reaction Biology, Inc. Los resultados fueron resumidos en la Tabla 2. Se observó la potente inhibición por el Compuesto 1 entre el tipo silvestre y CLAs mutantes y ROS1s.

20

Tabla 2

	NPM-CLA	CLA silvestre	T1151M CLA	1151Tins CLA	L1152R CLA	C1156Y CLA	F1174L CLA
IC ₅₀ (nM)	1,23	1,04	0,49	2,16	1,23	0,93	1,46
	F1174S CLA	L1196M CLA	G1202R CLA	S1206R CLA	G1269A CLA	G1269S CLA	R1275Q CLA
	ROS1 WT	ROS1 G2032R	ROS1-TPM3				
IC ₅₀ (nM)	0,0706	0,456	0,113				

Ejemplo 6: Compuesto 1 inhibió de manera potente la proliferación celular en líneas celulares primarias con

genes mutados o fusión oncogénica de CLA, ROS1, TRKA o JAK2.

Las fusiones de CLA son principales controladores de malignidad en varios tipos de cáncer y líneas celulares de cáncer, incluyendo líneas celulares de linfoma Karpas-299 que albergan el gen de fusión NPM-CLA, la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas H2228 que albergan el gen de fusión EML4-CLA, la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas HCC78 que albergan el gen de fusión de SLC34A2-ROS1, la línea celular del cáncer colorrectal KM12 que alberga el gen de fusión TPM3-TRKA, y la línea celular de leucemia SET-2 que alberga la mutación de JAK2 V617F. Se evaluaron las actividades de anti-proliferación del Compuesto 1 en estas líneas celulares y los resultados fueron resumidos en la Tabla 3.

Ejemplo 7: Evaluación de la actividad del Compuesto 1 contra un grupo de las mutaciones del gen CLA en líneas celulares Ba/F3 modificadas.

Además, se utilizaron células de Ba/F3 modificadas para expresar el gen de fusión de EML4-CLA de tipo silvestre y EML4-CLAs mutante. El crecimiento de las células Ba/F3 es dependiente en la interleucina-3 (IL-3). Con la expresión ectópica del gen EML4-CLA, el crecimiento celular de Ba/F3 se convierte en independiente de la IL-3 y recae en la actividad de la cinasa de la fusión oncogénica de CLA. El Compuesto 1 potentemente inhibió la proliferación celular de varias líneas celulares Ba/F3 con la expresión modificada de EML4-CLAs mutante y silvestre, y los resultados fueron resumidos en la Tabla 3.

La inhibición de la proliferación celular de las líneas celulares Ba/F3 TPR-CLA y Ba/F3 TPR-CLA L1196M fue realizada en Advanced Cellular Dynamics. El Compuesto 1 demostró una potente inhibición en ambas líneas celulares (Tabla 3).

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad del Compuesto 1 contra ROS1 en líneas celulares Ba/F3 modificadas.

Las células Ba/F3 se modificaron para expresar los genes de fusión SDC4-ROS1, SDC4-ROS1^{G2032R}, CD74-ROS1, y CD74-ROS1^{G2032R} oncogénicos, respectivamente. Las células Ba/F3 modificadas con genes de fusión ROS1 fueron utilizadas para examinar la actividad inhibidora del Compuesto 1 en genes de fusión ROS1 silvestres y mutantes. Los resultados de la inhibición del crecimiento celular fueron resumidos en la Tabla 3.

Las células Ba/F3 se modificaron para expresar los genes de fusión CD74-ROS1^{L2026M}, y CD74-ROS1^{D2033N}, respectivamente. Las células Ba/F3 modificadas con genes de fusión ROS1 fueron utilizadas para examinar la actividad inhibidora del Compuesto 1. Los resultados de la inhibición del crecimiento celular fueron resumidos en la Tabla 3.

Las células Ba/F3 se modificaron para expresar los genes de fusión LMNA-TRKA y LMNA-TRKA^{G595R}, respectivamente. Las células Ba/F3 modificadas con genes de fusión TRKA fueron utilizadas para examinar la actividad inhibidora del Compuesto 1. Los resultados de la inhibición del crecimiento celular fueron resumidos en la Tabla 3.

Las células Ba/F3 se modificaron para expresar los genes de fusión TEL-TRKB (también nombrados como ETV6-TRKB) y TEL-TRKB^{G639R}, respectivamente. Las células Ba/F3 modificadas con genes de fusión TRKB fueron utilizadas para examinar la actividad inhibidora del Compuesto 1. Los resultados de la inhibición del crecimiento celular fueron resumidos en la Tabla 3.

Las células Ba/F3 se modificaron para expresar los genes de fusión TEL-TRKC (también nombrados como ETV6-TRKC) y TEL-TRKC^{G623R}, respectivamente. Las células Ba/F3 modificadas con genes de fusión TRKC fueron utilizadas para examinar la actividad inhibidora del Compuesto 1. Los resultados de la inhibición del crecimiento celular fueron resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3

Ensayos	IC ₅₀ (nM)
Proliferación celular de la línea celular de Karpas-299	23,7
Proliferación celular de la línea celular de NCI-H2228	73
Proliferación celular de la línea celular de HCC78	0,3
Proliferación celular de la línea celular de KM 12	0,3
Proliferación celular de la línea celular de SET-2	169
Proliferación celular de la línea celular tipo silvestre de Ba/F3 EML4-CLA	17,8
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 EML4-CLA G1202R	20,5

(continuación)

Ensayos	IC ₅₀ (nM)
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 EML4-CLA L1152P	85
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 EML4-CLA L1196M	50
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 EML4-CLA F1174C	54
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 EML4-CLA C1156Y	98
Proliferación celular de la línea celular tipo silvestre de Ba/F3 TPR-CLA	12
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 TPR-CLA L1196M	13,4
Proliferación celular de la línea celular tipo silvestre de Ba/F3 CD74-ROS1	0,2
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R	8,4
Proliferación celular de la línea celular tipo silvestre de Ba/F3 SDC4-ROS1	0,2
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 SDC4-ROS1 G2032R ;	5
Proliferación celular de Ba/F3 +IL3 parental	1236
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 L2026M	5
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 D2033N	0,2
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 LMNA-TRKA	0,2
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 LMNA-TRKA G595R	0,4
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 TEL-TRKB (ETV6-TRKB)	0,2
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 TEL-TRKB (ETV6-TRKB) G639R	0,6
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 TEL-TRKC (ETV6-TRKC)	0,2
Proliferación celular de la línea celular de Ba/F3 TEL-TRKC (ETV6-TRKC) G623R	3

Ejemplo 9: Mecanismo de acción del Compuesto 1 en las células.

- 5 Se evaluó la actividad inhibidora farmacodinámica del Compuesto 1 en CLA, ROS1, TRKA y SRC, y la correspondiente señalización descendente en las células, y los resultados fueron resumidos en la Tabla 4. El Compuesto 1 provocó la supresión de la autofosforilación de CLA así como la fosforilación de STAT3 y AKT descendente la IC₅₀s de alrededor de 1-3 nM en la línea celular de Karpas-299, que alberga el gen de fusión NPM-CLA. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de ROS1 así como la fosforilación de STAT3 y AKT descendente en IC₅₀s de alrededor de 1-3 nM en la línea celular de HCC78, que alberga el gen de fusión SLC34A2-ROS1. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de TRKA así como la fosforilación de AKT y ERK descendente en IC₅₀s de alrededor de 0,3 nM en la línea celular de KM12, que alberga el gen de fusión TPM3-TRKA. El Compuesto 1 inhibió la fosforilación de STAT5 en IC₅₀ alrededor de 158 nM en la línea celular SET-2, que alberga la mutación de JAK2 V617F. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de CLA con IC₅₀ of 20-30 nM en las líneas celulares estables modificadas de Ba/F3 que codifican los genes de fusión EML4-CLA v1 mutante de G1202R o tipo silvestre. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de ROS1 en las líneas celulares estables modificadas de Ba/F3 que codifican los genes de fusión de CD74-ROS1 or SDC4-ROS1 mutante de G2032R o tipo silvestre. Se evaluó la actividad inhibidora farmacodinámica del Compuesto 1 en la señalización de TRKA, TRKB, TRKC, y FAK en las células, y los resultados se resumieron en la Tabla 4a. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de FAK así como la fosforilación de paxilina de sustrato de SRC IC₅₀ de alrededor de 103 nM en la línea celular de NCI-H2228, que alberga el gen de fusión EML4-CLA con la señalización de SRC y FAK regulada a la alza. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de ROS1 en las líneas celulares estables modificadas de Ba/F3 que codifican los genes de fusión de CD74-ROS1 mutante de D2033N o L2026M. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de TRKA en las líneas celulares estables modificadas de NIH3T3 que codifican los genes de fusión de LMNA-TRKA mutante de G595R o tipo silvestre. El Compuesto 1 inhibió la autofosforilación de TRKB en las líneas celulares estables modificadas de NIH3T3 que codifican TEL-TRKB mutante de G639R o tipo silvestre, también llamados como genes de fusión de ETV6-TRKB.

Tabla 4

Ensayos	IC ₅₀ (nM)
Fosforilación de CLA de la línea celular de Karpas-299	0,9
Fosforilación de CLA de la línea celular de NCI-H2228	5,8
Fosforilación de CLA de la línea celular de Ba/F3 EML4-ALK WT	29,9

(continuación)

Ensayos	IC ₅₀ (nM)
Fosforilación de CLA de la línea celular de Ba/F3 EML4-ALK G1202R	18,4
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de HCC78	2
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 WT	0,3
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R	3
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de Ba/F3 SDC4-ROS1 WT	0,5
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de Ba/F3 SDC4-ROS1 G2032R	2
Fosforilación de TRKA de la línea celular de KM 12	0,35
Fosforilación de STAT5 de la línea celular de SET-2	158
Fosforilación de SRC de la línea celular de H2228	102
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 L2026M	10
Fosforilación de ROS1 de la línea celular de Ba/F3 CD74-ROS1 D2033N	<1
Fosforilación de TRKA de la línea celular de NIH3T3 LMNA-TRKA	0,01
Fosforilación de TRKA de la línea celular de NIH3T3 LMNA-TRKA G595R	0,1
Fosforilación de TRKB de la línea celular de NIH3T3 TEL-TRKB	<0,1
Fosforilación de TRKB de la línea celular de NIH3T3 TEL-TRKB G639R	1
Fosforilación de FAK de la línea celular de NCI-H2228	100

El Compuesto 1 aumentó el número de células apoptóticas de Karpas-299. Después del tratamiento de 48 horas con el Compuesto 1, las células Karpas-299 fueron lisadas y evaluadas con el ensayo de escisión 3/7 de caspasa de caspasa 3 glo o PARP en ensayo de Western blot. Los resultados se presentan en la figura 1.

El Compuesto inhibió la migración celular de HCC78 o HT1080 después de un tratamiento de 12 horas en los ensayos de cicatrización de herida. Los resultados se presentan en la figura 2

Compuesto 1 reguló a la baja la expresión de EGFR en las células H2228

La activación de la actividad de la cinasa SRC regula al alza el nivel de expresión de RTK, llevando a la resistencia de vía de señalización de derivación. La inhibición de SRC resultará en la regulación a la baja de RTKs. El Compuesto 1 reguló a la baja expresión de EGFR en una manera dependiente de la dosis y del tiempo como se muestra en la figura 3.

Compuesto 1 reguló a la baja la expresión de EGFR en las células H2228

CD44 es un biomarcador de la estaminalidad del cáncer. Un alto nivel de expresión de CD44 se descubrió en las células H2228. El Compuesto 1 suprimió el nivel de expresión de CD44 en las células H2228 en una manera dependiente de la concentración después de un tratamiento de 48 horas como se muestra en la figura 4, indicando que el Compuesto 1 tiene el potencial para inhibir la estaminalidad del cáncer.

Estudios *in vivo*

Eficacia antitumoral del Compuesto 1 en modelos de tumores de xenoinjerto

La eficacia antitumoral del Compuesto 1 se evaluó en varios modelos de xenoinjerto de tumores que representan poblaciones de cáncer en las que la desregulación de CLA, ROS1 o TRKA está implicada.

Ejemplo 10: Modelo de ALCL de Karpas 299

El gene de fusión NPM-CLA en las células de Karpas 299 es probado como el controlador para el crecimiento del tumor. Los ratones SCID/Beige que portan tumores de Karpas 299 (en el tamaño de tumor promedio de 160 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante siete días (figura 5). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor (TMV) por el calibrador en los días indicados y se muestra en la media $\pm$ sem en la figura 5. Un * indica que la media de los TMVs es significativamente inferior en el

grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. Inhibición del crecimiento tumoral (TGI) fue calculada como $100 \% * \{1 - [(TMV_{Tratado \text{ Último día de tratamiento}} - TMV_{Tratado \text{ Primer Día de tratamiento}}) / (TMV_{Control \text{ en último día de tratamiento}} - TMV_{Control \text{ en primer día de tratamiento}})]\}$ cuando $TMV_{Tratado \text{ último día de tratamiento}} \geq TMV_{tratado \text{ primer día de tratamiento}}$. En el caso de $TMV_{Tratado \text{ último día de tratamiento}} < TMV_{Tratado \text{ Primer día de tratamiento}}$, la regresión del tumor (REG) se calculó como un $100 \% * (1 - TMV_{Tratado \text{ último día de tratamiento}} / TMV_{Tratado \text{ primer día de tratamiento}})$. En este estudio, el Compuesto 1 demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor a 59 % y 94 % en las dosificaciones de 15 mg/kg y 50 mg/kg dos veces al día, respectivamente. Además, 4 de 8 ratones en el grupo de tratamiento de 50 mg/kg presentó una regresión del tumor. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados de los ratones y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 6).

Ejemplo 11: Modelo NIH3T3 EML4-CLA tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés)

Los ratones atímicos desnudos que portan los tumores de NIH3T3 EML4-CLA WT (en el tamaño de tumor promedio de 120 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante 12 días (figura 7). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 7. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento del Compuesto 1 a 50 mg/kg/dos veces al día resultó en una regresión del tumor de 41 %, con 8 de 8 ratones que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg/dos veces al día demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 90 %, con 2 de 8 ratones que presentaron la regresión del tumor. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados de los ratones y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 8).

Ejemplo 12: Modelo NIH3T3 SDC4-ROS1 WT

El gen de fusión SDC4-ROS1 es considerado como el controlador para la progresión del tumor en NSCLC. Los ratones atímicos desnudos que portan los tumores de NIH3T3 SDC4-ROS1 WT (en el tamaño de tumor promedio de 100 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante 26 días (figura 9). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 9. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento del Compuesto 1 a 50 mg/kg al día resultó en una regresión del tumor de 69 %, con 7 de 7 ratones que presentaron la regresión del tumor. Los ratones en el grupo de 15 mg/kg del Compuesto 1 también demostró 39 % de regresión de tumor, con 7 de 8 ratones en este grupo que presentaron regresión del tumor.

Ejemplo 13: Modelo de cáncer colorrectal KM12

La actividad aberrante del TPM3-TRKA está considerada como el controlador subyacente para el crecimiento tumoral en el modelo KM12. Los ratones atímicos desnudos que portan los tumores de KM12 (en el tamaño de tumor promedio de 100 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante siete días (figura 10). Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 10. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg y 75 mg/kg resultó en 13 % y 11 % de regresión del tumor, respectivamente. En el grupo de 15 mg/kg, 8 de 8 ratones presentaron regresión del tumor. En el grupo de 75 mg/kg, 5 de 8 ratones presentaron regresión del tumor. No se observó pérdida del peso corporal en los ratones tratados con el Compuesto 1 en comparación con los del vehículo de control (figura 11).

Ejemplo 14: Relación de la inhibición de CLA a la eficacia antitumoral después de la administración del Compuesto 1

Para evaluar el efecto del Compuesto 1 en la inhibición de la fosforilación de CLA, los tumores de Karpas 299 fueron cosechados en 3 horas o 12 horas después de última dosis del Compuesto 1 en un estudio de dosificación repetida (15 mg/kg o 50 mg/kg, dos veces al día por siete 7 días). Se determinó el nivel de fosforilación de CLA por inmunotransferencia combinada con la cuantificación de señal por el Image Studio Digit Software. La capacidad del Compuesto 1 para inhibir la fosforilación de CLA se ilustró en la figura 12. En la dosis de 50 mg/kg, la fosforilación de CLA se redujo a <5 % del nivel de control a las 3 horas después de la administración oral del Compuesto 1 y se mantuvo en alrededor de 10 % del nivel de control a las 12 horas después de la dosificación. Este nivel de inhibición de la fosforilación corresponde al 94 % de TGI. En la dosis de 15 mg/kg, la fosforilación de CLA se redujo a <10 % del nivel de control a las 3 horas después de la administración oral y se mantuvo en alrededor de 21 % del nivel de control a las 12 horas después de la dosificación. Este nivel de fosforilación de CLA corresponde al 59 % de TGI. Estos resultados apoyan el vínculo entre la inhibición de CLA, el objetivo del Compuesto 1 y el grado de eficacia antitumoral en un modelo de tumor dependiente de NPM-CLA.

Ejemplo 15: Estudios dependientes de la dosis en el modelo de cáncer colorrectal de KM12

Para investigar el efecto dependiente de la dosis del Compuesto 1 en la inhibición del tumor en el modelo de cáncer colorrectal de KM12, los ratones atímicos desnudos que portan los tumores de KM12 (en el tamaño de tumor promedio de 125 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 oralmente dos veces al día durante siete días en dosificaciones iguales o menores a 15 mg/kg durante siete días (figura 13). Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 13. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el Compuesto 1 inhibió el crecimiento del tumor de forma dependiente de la dosis. El tratamiento con el Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg resultó en una regresión del tumor de 1 %, con 5 de 10 ratones que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 3 mg/kg demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 91 %, con 2 de 10 ratones que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 1 mg/kg demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 77 %. No se observó pérdida de peso corporal en los ratones tratados con el Compuesto 1 en comparación con los del vehículo de control (figura 14).

Ejemplo 16: Modelo Ba/F3 EML4-CLA WT

Los ratones SCID/Beige que portan los tumores de Ba/F3 EML4-CLA WT (en el tamaño de tumor promedio de 190 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante 14 días (figura 15). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 15. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 a 75 mg/kg resultó en una regresión del tumor de 54 %, con 6 de 8 ratones que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg/dos veces al día demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 74 %. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 16).

Ejemplo 17: Modelo Ba/F3 EML4-CLA G1202R

Para investigar el efecto del Compuesto 1 en la inhibición del crecimiento de los tumores que contienen las mutaciones frontales de disolvente resistente a fármaco, los ratones SCID/Beige que portan los tumores de Ba/F3 EML4-CLA G1202R (en el tamaño de tumor promedio de 210 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 oralmente dos veces al día durante 17 días (figura 17). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 17. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento del Compuesto 1 a 75 mg/kg resultó en la inhibición del crecimiento del tumor con un TGI del 99 %. 4 de 8 ratones presentaron la regresión del tumor en este grupo. El Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 56 %. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 18).

Ejemplo 18: Modelo Ba/F3 CD74-ROS1 WT

El gen de fusión CD74-ROS1 es considerado como uno de los controladores para la progresión del tumor en NSCLC. Los ratones SCID/Beige que portan los tumores de Ba/F3 CD74-ROS1 WT (en el tamaño de tumor promedio de 200 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante 12 días (figura 19). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 19. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 a 75 mg/kg resultó en una regresión del tumor de 100 %, con 8 de 8 ratones que presentaron la completa regresión del tumor. Los ratones en el grupo de 15 mg/kg del Compuesto 1 también demostró 97 % de regresión de tumor, con 8 de 8 ratones en este grupo que presentaron regresión del tumor. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 20).

Ejemplo 19: Modelo Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R

Para investigar el efecto del Compuesto 1 en la inhibición del crecimiento de los tumores que contienen las mutaciones frontales de disolvente resistente a fármaco, los ratones SCID/Beige que portan los tumores de Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R (en el tamaño de tumor promedio de 210 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 oralmente dos veces al día durante 11 días (figura 21). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 21. Un * indica que los

volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 a 75 mg/kg resultó en una regresión del tumor de 100 %, con 8 de 8 ratones que presentaron la completa regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg/dos veces al día demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 99 %, con 2 de 8 ratones en este grupo que presentaron la regresión del tumor. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 22).

Ejemplo 20: Modelo NIH3T3 LMNA-TRKA WT

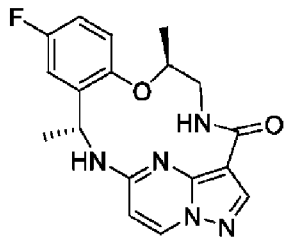
El gen de fusión LMNA-TRKA es considerado como uno de los controladores para la progresión del tumor en el cáncer colorrectal. Los ratones atímicos desnudos que portan los tumores de NIH3T3 LMNA-TRKA WT (en el tamaño de tumor promedio de 240 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 por vía oral dos veces al día durante 5 días (figura 23). Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 23. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg resultó en una regresión del tumor de 28 %, con 7 de 8 ratones que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 3 mg/kg demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 100 %, con 3 de 8 ratones que presentaron la regresión del tumor. No se observó pérdida del peso corporal en los ratones tratados con el Compuesto 1 en comparación con los del vehículo de control (figura 24).

Ejemplo 21: Modelo NIH3T3 LMNA-TRKA G595R

Para investigar el efecto del Compuesto 1 en la inhibición del crecimiento de los tumores que contienen las mutaciones frontales de disolvente resistente a fármaco, los ratones atímicos desnudos que portan los tumores de NIH3T3 LMNA-TRKA G595R (en el tamaño de tumor promedio de 230 mm³) fueron dosificados con el Compuesto 1 oralmente dos veces al día durante cinco días (figura 25). El grupo de control de los ratones sólo se les dio vehículo. Se midió el volumen del tumor por el calibrador en los días indicados y se muestra como media $\pm$ sem en la figura 25. Un * indica que los volúmenes de tumor medios son significativamente inferiores en el grupo tratado en comparación con el grupo control ($p < 0,05$) según lo determinado por ANOVA repetido de dos vías seguido de análisis posterior. En este estudio, el tratamiento con el Compuesto 1 a 60 mg/kg resultó en una regresión del tumor de 23 %, con 10 de 10 ratones que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 15 mg/kg al día demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 97 %, con 3 de 8 ratones en este grupo que presentaron la regresión del tumor. El Compuesto 1 en la dosificación de 3 mg/kg demostró la capacidad para inhibir el crecimiento del tumor en un TGI del 56 %. El peso corporal de los ratones fue medido en los días señalados y no se observó pérdida de peso corporal en los grupos de tratamiento del Compuesto 1 (figura 26).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto (7S,13R)-11-fluoro-7,13-dimetil-6,7,13,14-tetrahydro-1,15-etenopirazolo[4,3-f][1,4,8,10]benzoxatriazaciclotridecin-4(5H)-ona, que tiene la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es mediado por

- (i) una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión EML4-CLA que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en L1196M, G1202R, D1203R, L1152P/R, F1174C/L/V, C1156Y, I1171N, G1123S, S1206Y, G1269S/A e inserción de 1151T; o
- (ii) una CLA genéticamente alterada que es una proteína de fusión TPR-CLA que tiene una mutación puntual L1196M, o
- (iii) una CLA genéticamente alterada que tiene una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en R1050H, F1174C/I/L/S/V, F1245C/I/L/V, R1275L/Q, T1151M, M1166R, I1170N, I1170S, I1171N, I1183T, L1196M, A1200V, L1204F, L1240V, D1270G, Y1278S, R1192P, G1128A, G1286R, y T1343I; o
- (iv) una proteína de fusión LMNA-TRKA; o
- (v) una proteína de fusión QKI-TRKB o ETV6-TRKB; o
- (vi) una proteína de fusión ETV6-TRKC.

2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la CLA genéticamente alterada es una proteína de fusión EML4-CLA que tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en L1196M, G1202R, D1203R, L1152P/R, F1174C/L/V, C1156Y, I1171N, G1123S, S1206Y, G1269S/A, e inserción de 1151T.

3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la CLA genéticamente alterada es una proteína de fusión EML4-CLA que tiene al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en L1196M, G1202R, L1152P/R, F1174C/L, C1156Y, G1269S, e inserción de 1151T.

4. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la CLA genéticamente alterada es una proteína de fusión TPR-CLA que tiene una mutación puntual L1196M.

5. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la CLA genéticamente alterada tiene una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en R1050H, F1174C/I/L/S/V, F1245C/I/L/V, R1275L/Q, T1151M, M1166R, I1170N, I1170S, I1171N, I1183T, L1196M, A1200V, L1204F, L1240V, D1270G, Y1278S, R1192P, G1128A, G1286R, y T1343I.

6. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde la CLA genéticamente alterada tiene una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en F1174S, R1275Q, y T1151M.

7. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión LMNA-TRKA.

8. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión LMNA-TRKA que comprende una mutación puntual G595R.

9. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión QKI-TRKB o ETV6-TRKB.

10. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión ETV6-TRKB.

11. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión ETV6-TRKB que comprende una mutación puntual G639R.

12. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión ETV6-

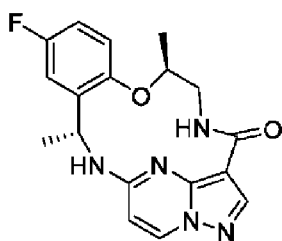
TRKC.

13. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es mediado por una proteína de fusión ETV6-TRKC que comprende una mutación puntual G623R.

14. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), neuroblastoma, tumor miofibroblástico inflamatorio, carcinoma de células renales adultas, carcinoma de células renales pediátricas, cáncer de mama, adenocarcinoma de colon, glioblastoma, glioblastoma multiforme y cáncer de tiroides anaplásico.

15. El compuesto para el uso de la reivindicación 14, en donde el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

16. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el compuesto tiene la fórmula:



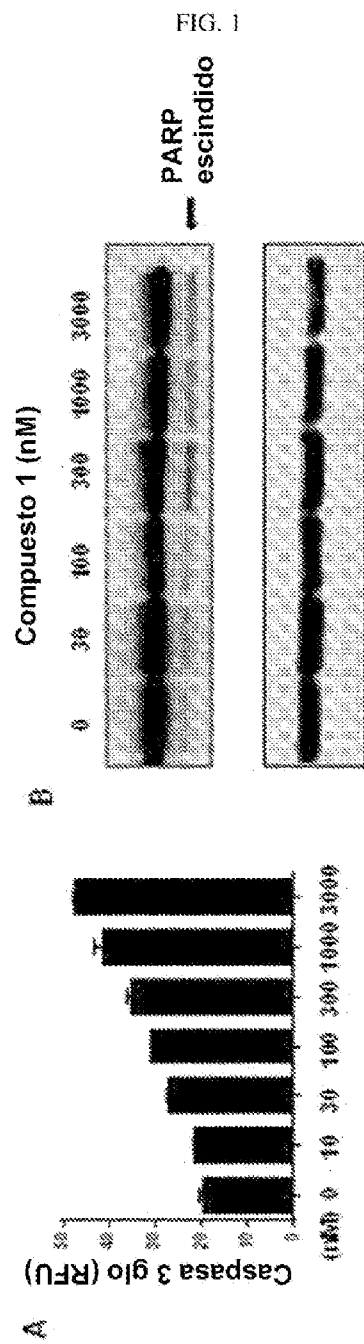


FIG. 2

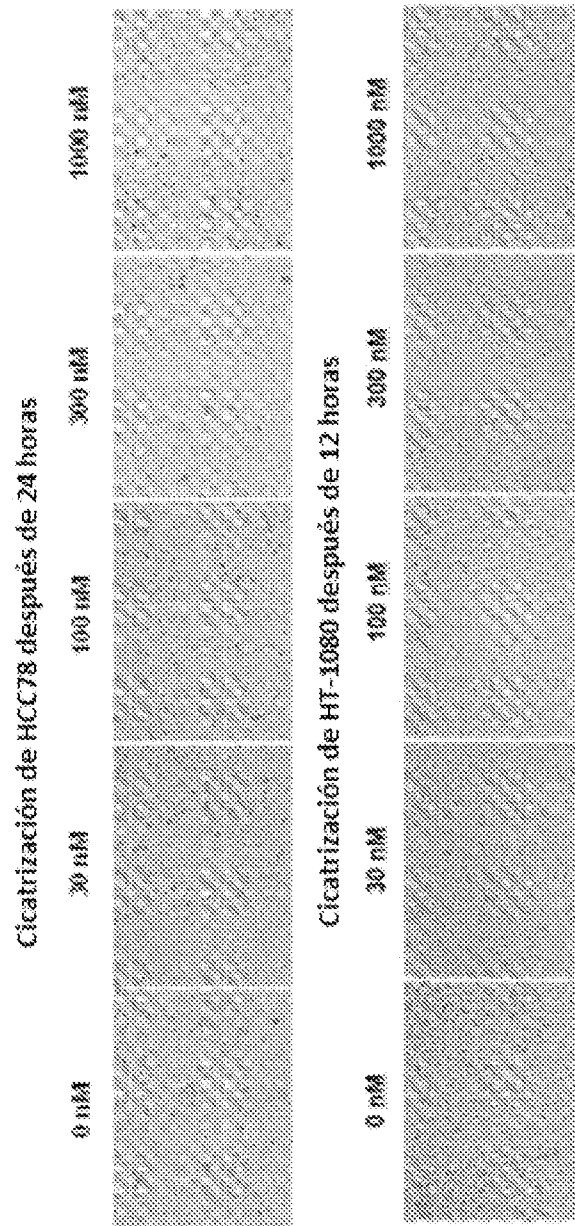


FIG. 3

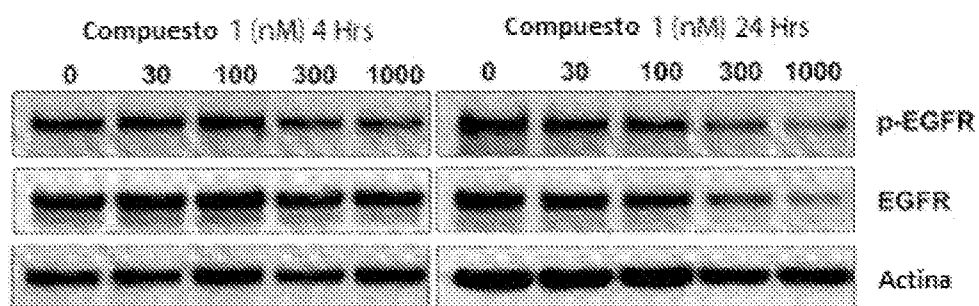


FIG. 4

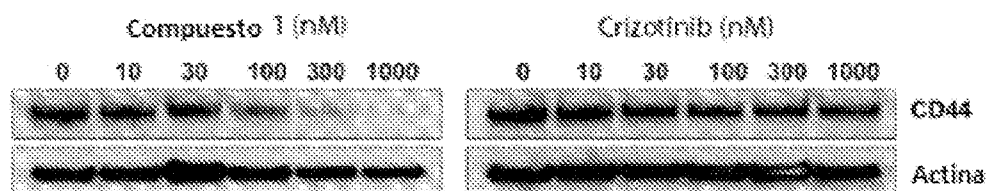


FIG. 5

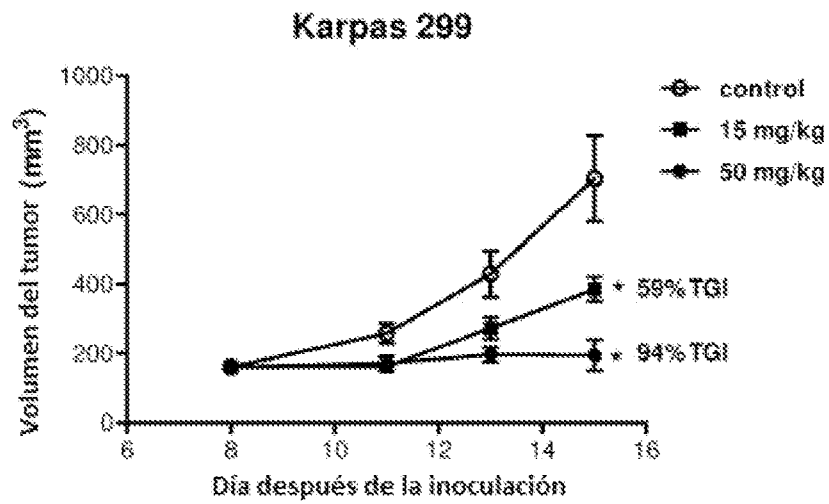


FIG. 6

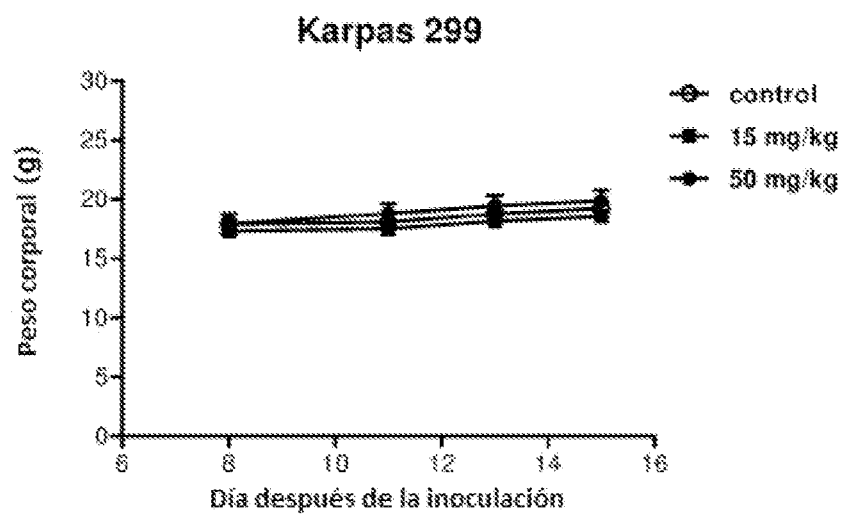


FIG. 7

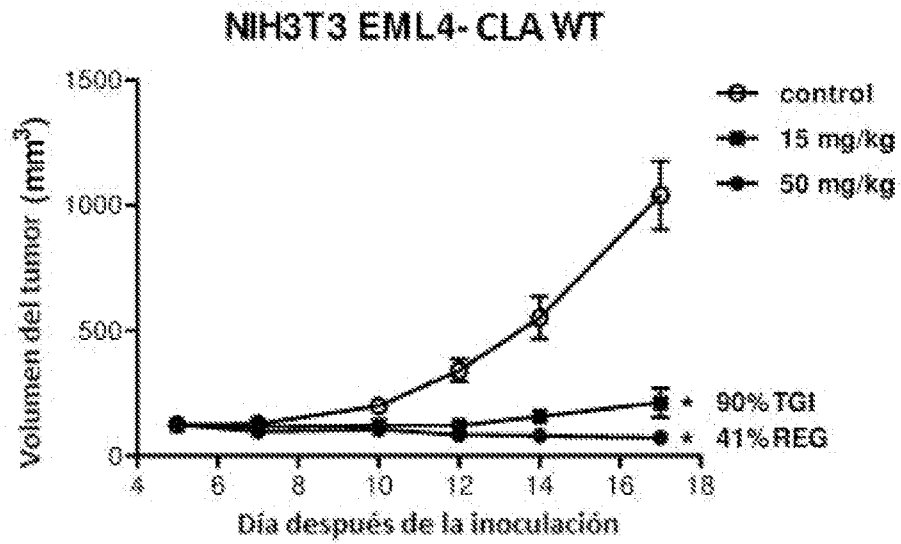


FIG. 8

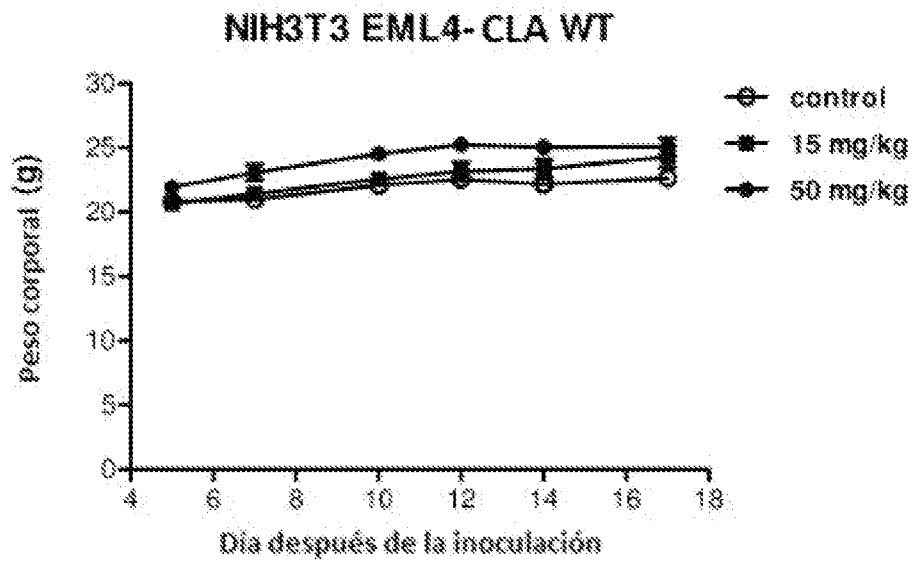


FIG. 9

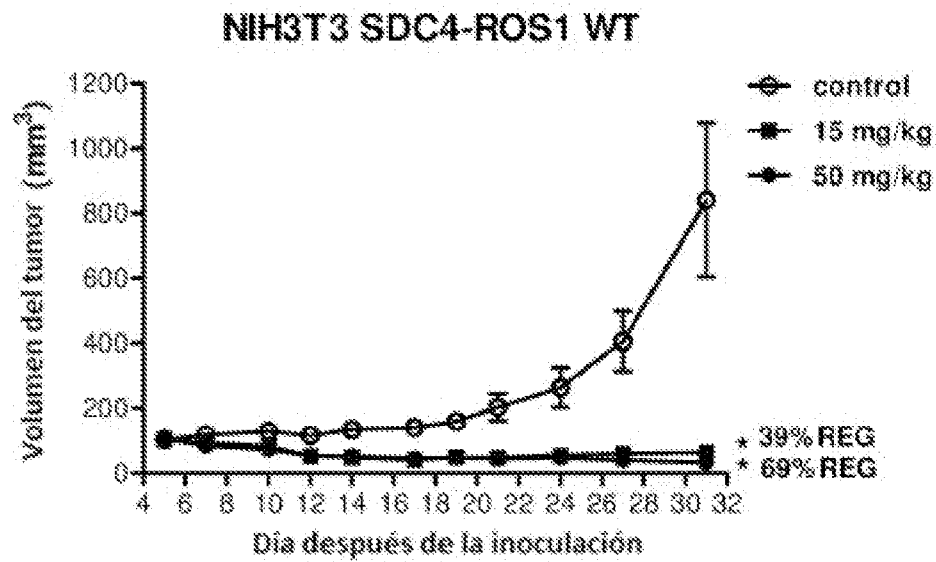


FIG. 10

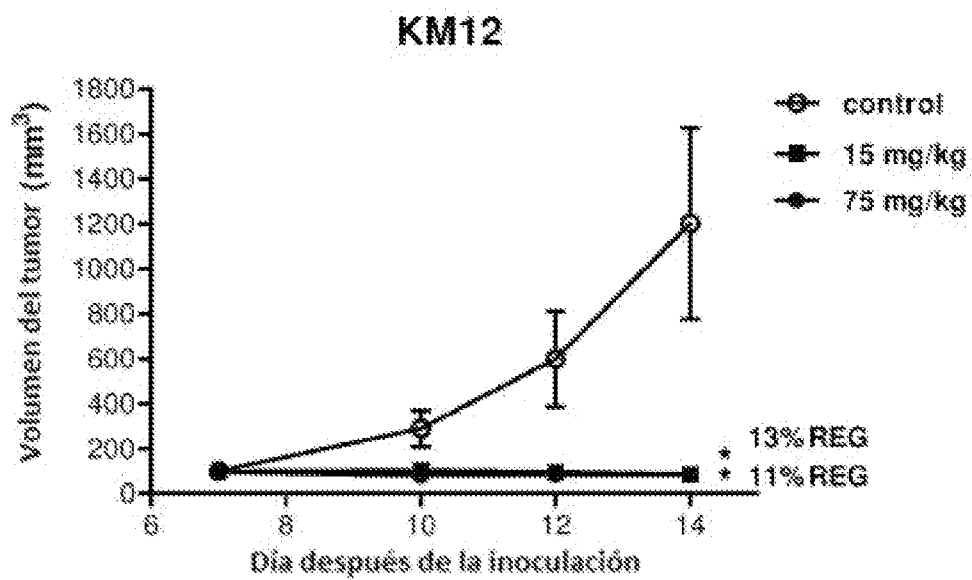


FIG. 11

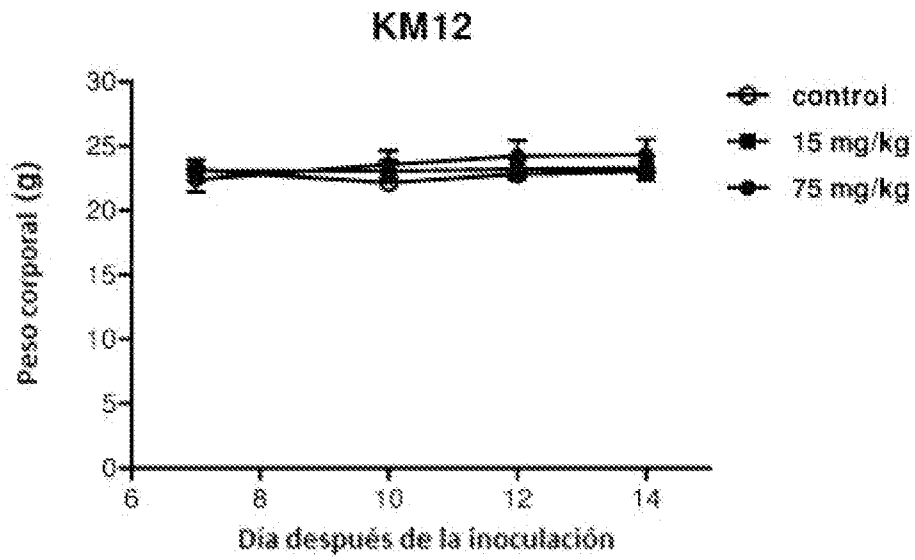


FIG. 12

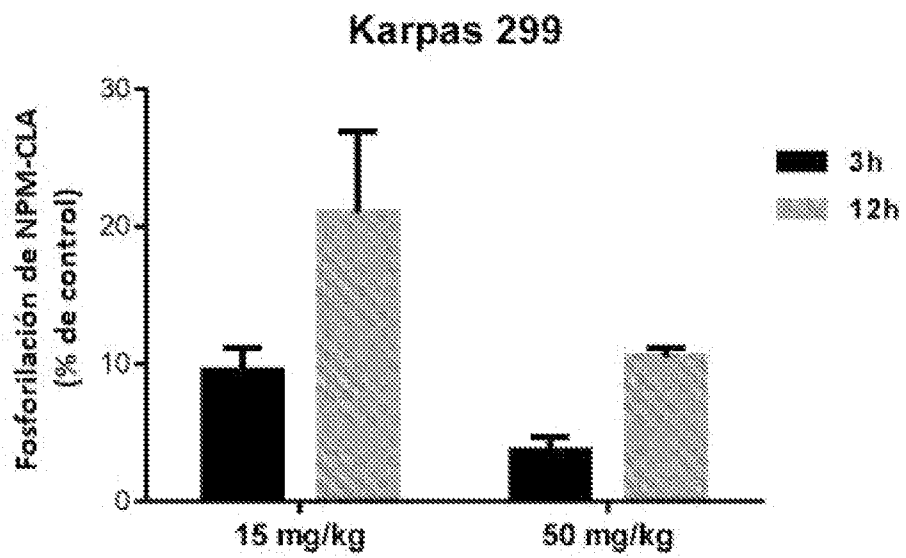


FIG. 13

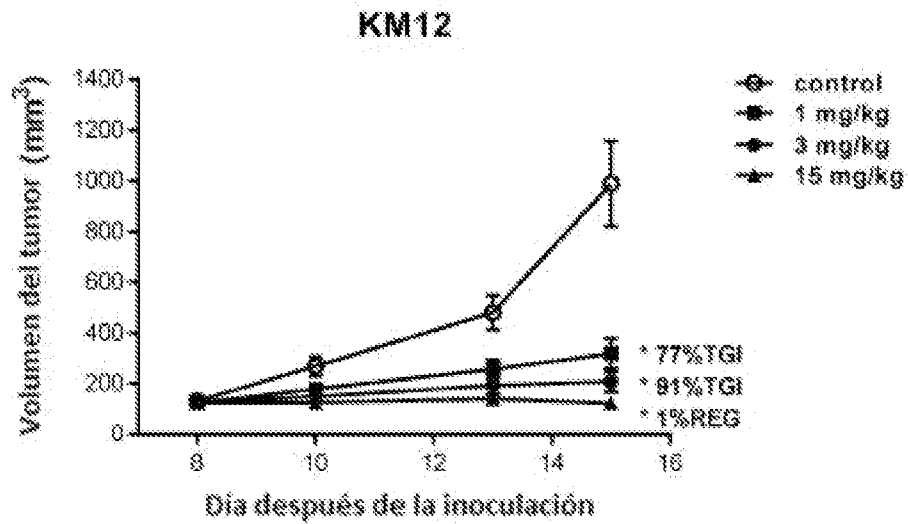


FIG. 14

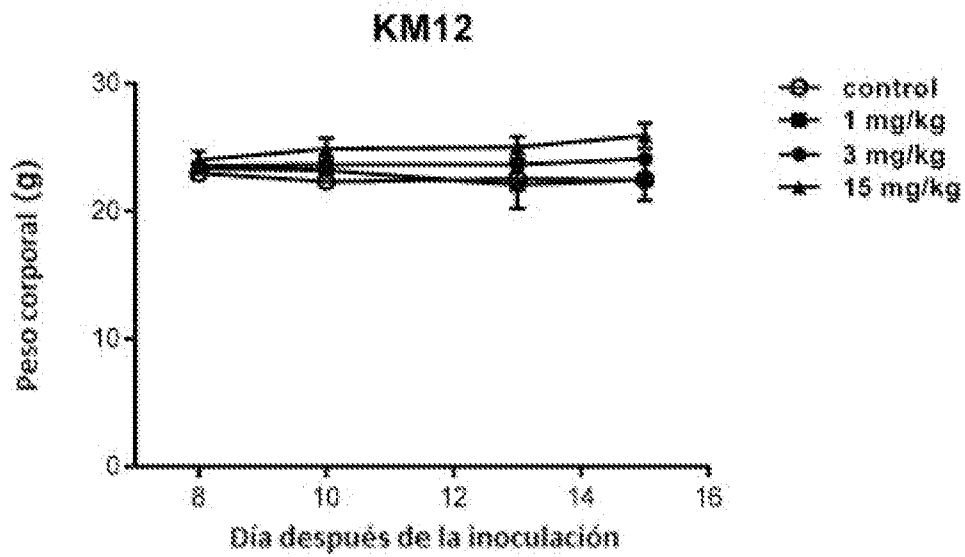


FIG. 15

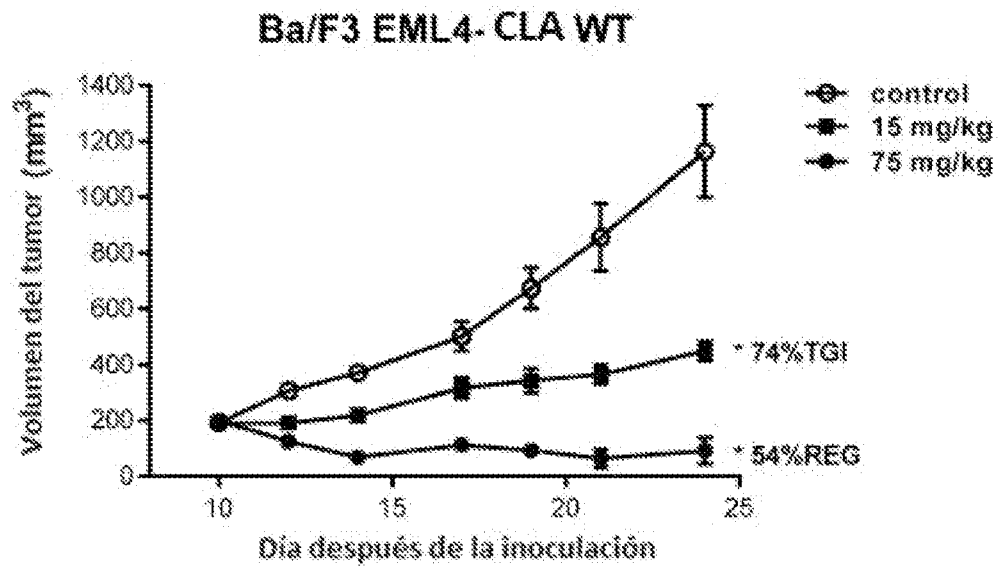


FIG. 16

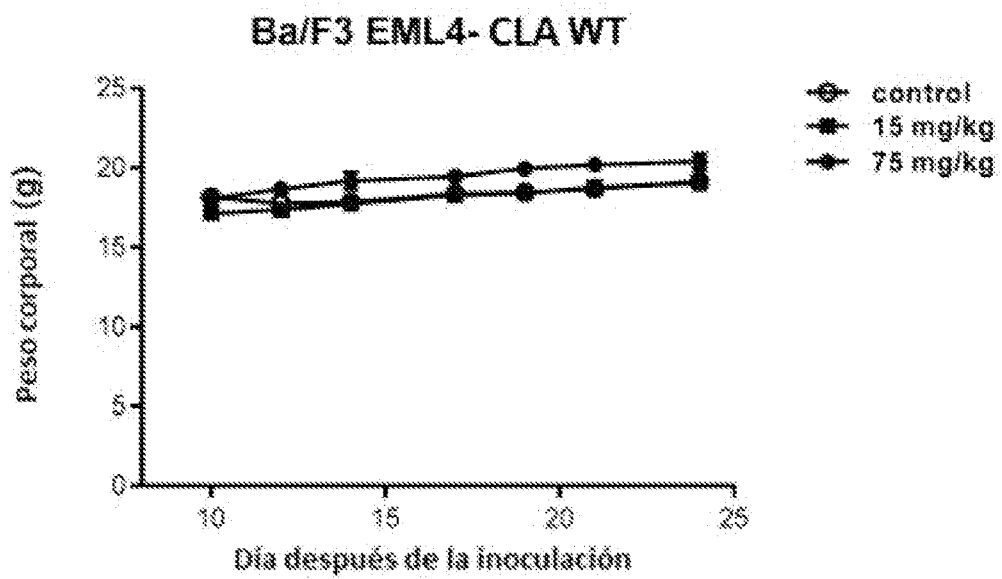


FIG. 17

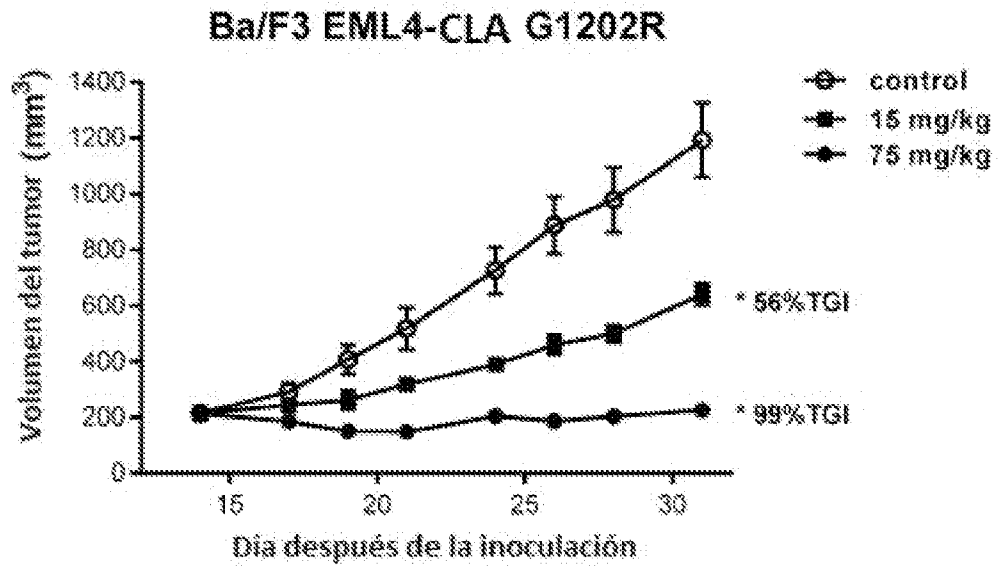


FIG. 18

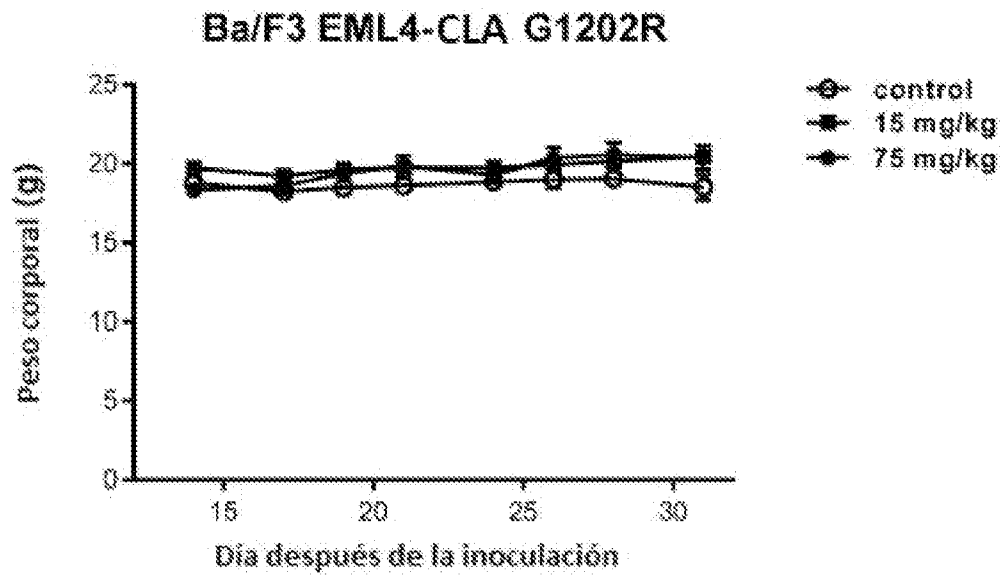


FIG. 19

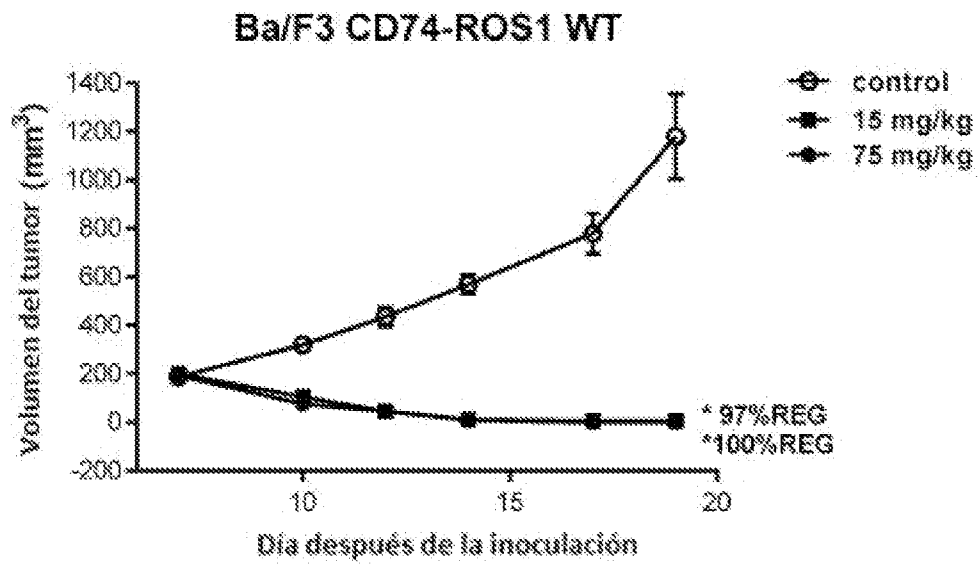


FIG. 20

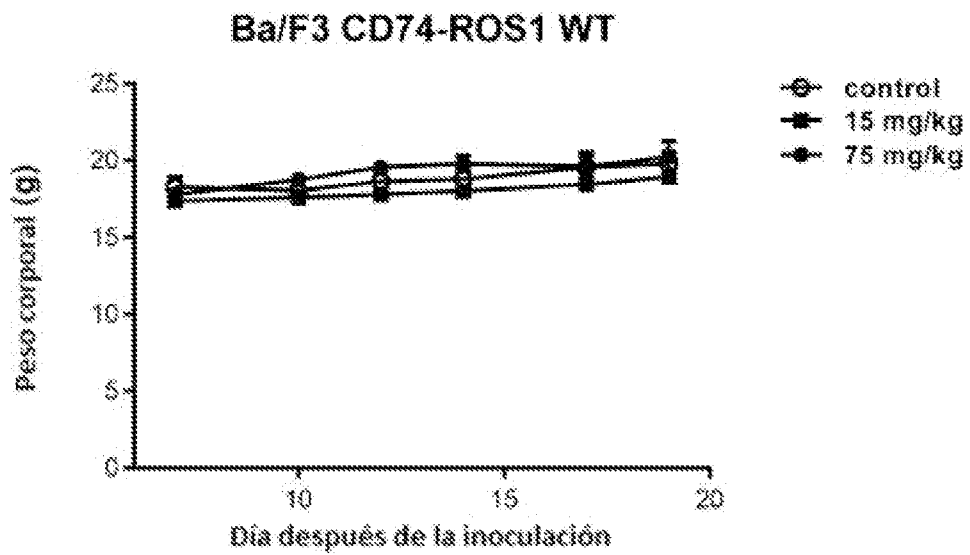


FIG. 21

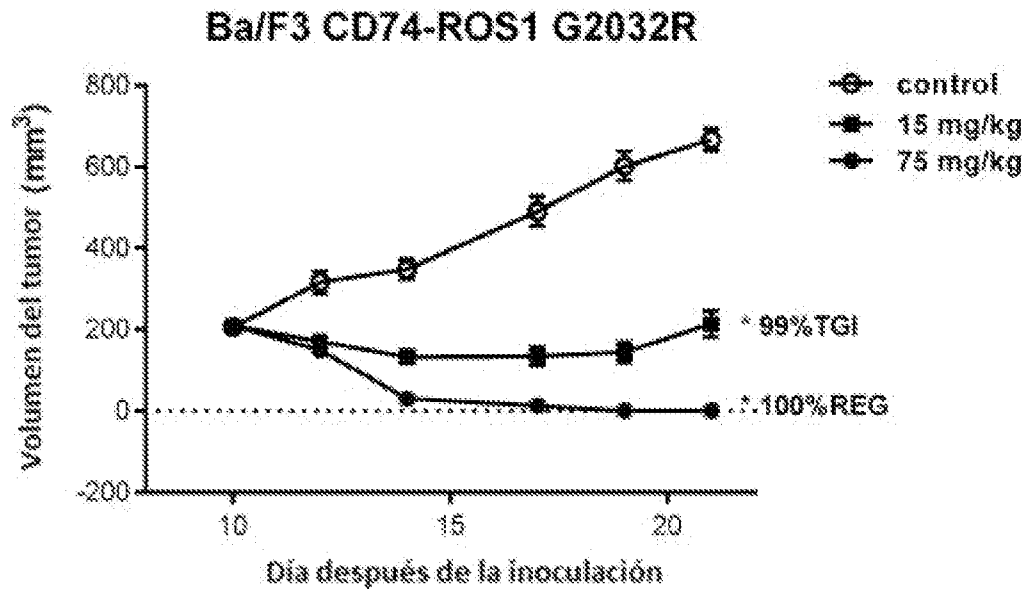


FIG. 22

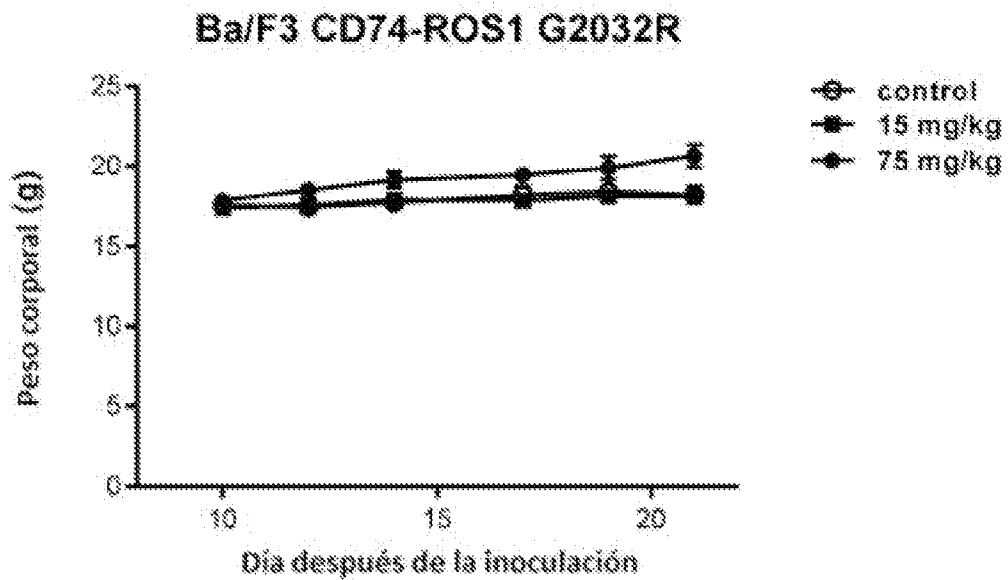


FIG. 23

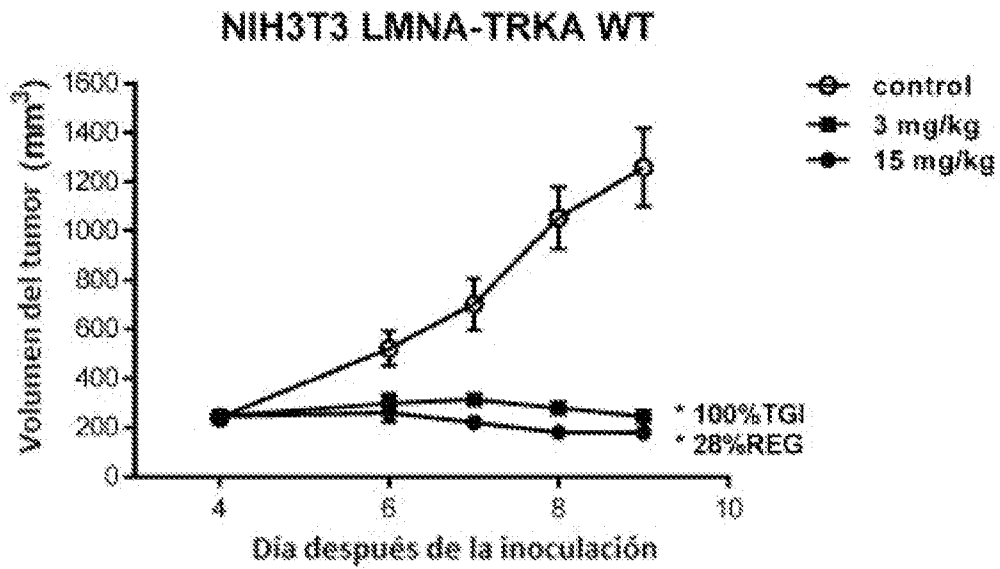


FIG. 24

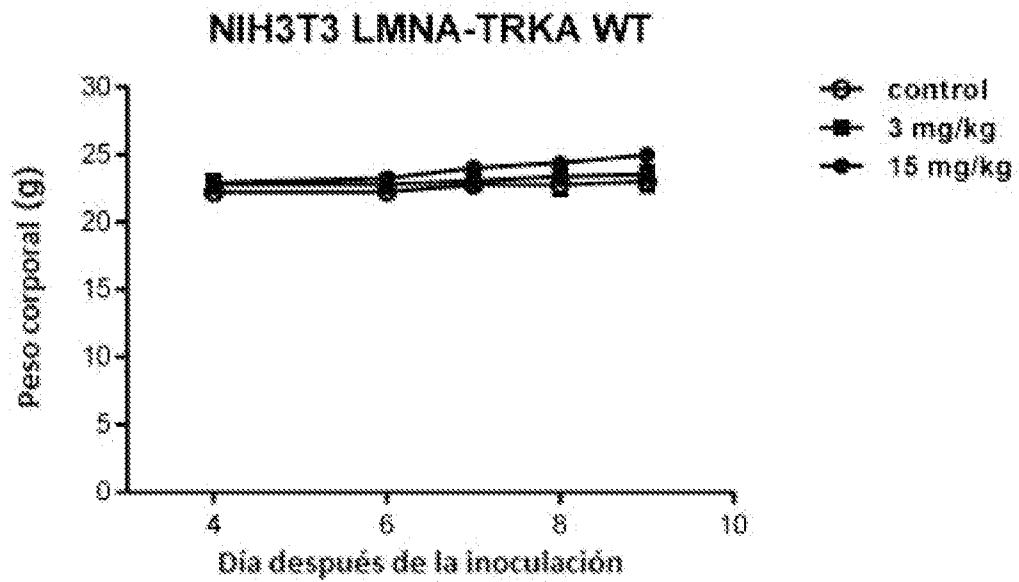


FIG. 25

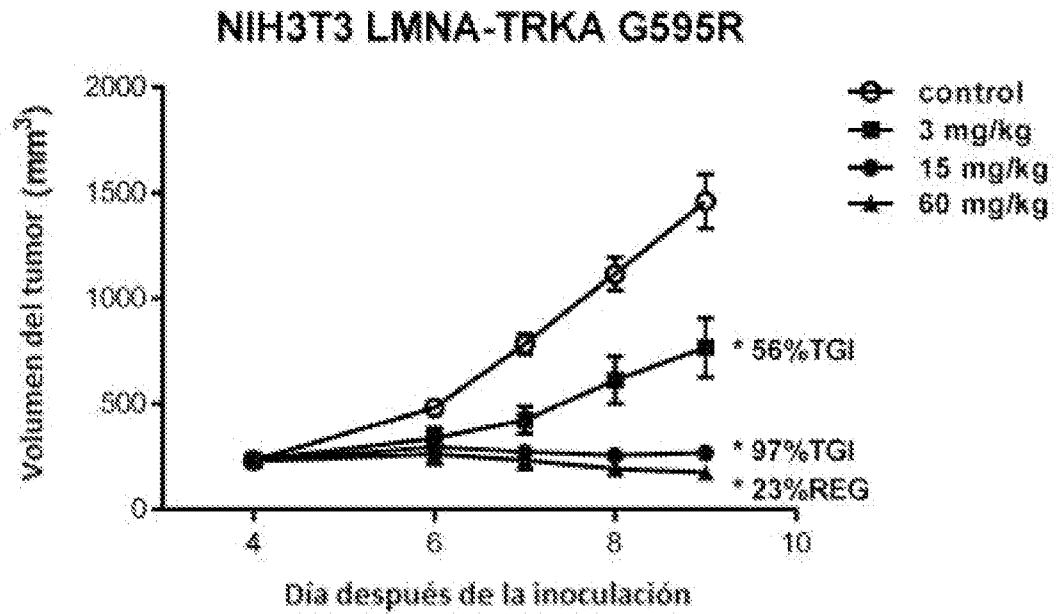


FIG. 26

