

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 074**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/4375** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2020 PCT/EP2020/058425**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2020 WO20193660**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2020 E 20715020 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3947375**

54 Título: **Compuestos de imidazonilquinolina y usos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

**27.03.2019 EP 19165664**

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

**28.10.2024**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
Frankfurter Strasse 250  
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**FUCHSS, THOMAS;  
BECKER, AXEL;  
KUBAS, HOLGER y  
GRAEDLER, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 984 074 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de imidazoloni quinolina y usos terapéuticos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona atropisómeros y derivados deuterados del inhibidor de ATM 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluoro-5-metoxipiridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona así como sales farmacéuticamente aceptables y formas sólidas de las mismas. Estos compuestos son útiles en la inhibición, regulación y/o modulación de la transducción de señales por ATM cinasa. La invención también proporciona composiciones que comprenden esos atropisómeros, formas sólidas, sales farmacéuticamente aceptables y derivados deuterados de la presente invención, así como estas composiciones para uso en el tratamiento de  
10 diversos trastornos relacionados con ATM cinasa, en particular cáncer.

Antecedentes de la invención

15 La proteína cinasa de serina/treonina ATM (cinasa mutada de ataxia telangiectasia) pertenece a la familia de cinasas PIKK con dominios catalíticos, que son homólogos a las cinasas fosfoinositido-3 (cinasa PI3, PI3K). Estas cinasas están implicadas en una variedad de funciones celulares clave, tal como el crecimiento celular, la proliferación celular, la migración, la diferenciación, la supervivencia y la adhesión celular. En particular, estas cinasas responden al daño del ADN activando programas de detención del ciclo celular y reparación del ADN (DDR: respuesta al daño del ADN). ATM es un producto del gen ATM y desempeña un papel clave en la reparación del daño de la doble hebra del ADN (DSB: rupturas de la doble hebra) mediante recombinación homóloga y unión de extremo a extremo no homóloga (NHEJ). Este tipo de daño de doble hebra es particularmente citotóxico.

20 Una de las principales características de los tumores en humanos es su inestabilidad genómica, con los defectos específicos del mecanismo de reparación del ADN aún no conocidos en la mayoría de los cánceres. Esta inestabilidad representa el punto de partida terapéutico de la quimioterapia, que se practica predominantemente desde hace algún tiempo. Además, hay algunos síndromes en los que el factor genético subyacente es la pérdida de una mutación asociada a la función de un gen que modula la respuesta al daño de la doble hebra del ADN. Esto  
25 incluye ataxia telangiectasia, que es causada por un gen ATM defectuoso. Una característica común de todos estos síndromes es que causan una extrema sensibilidad a la radiación (Lavin y Shiloh (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 177; Rotman y Shiloh (1998) Hum. Mol. Genet. 7: 1555). En consecuencia, las células deficientes en ATM son sensibles a agentes y otras medidas que causan daño al dúplex del ADN, lo que convierte a la ATM en un objetivo atractivo para la sensibilización a la quimioterapia y a la radiación en el tratamiento del cáncer.

30 En resumen, la ATM (cinasa mutada de ataxia telangiectasia) es un regulador clave de la reparación de la ruptura de la doble hebra del ADN, que es inducida por radio y quimioterapia ampliamente usadas. ATM transmite una señal generalizada a una multitud de efectores descendentes, incluido p53. Las rupturas de doble hebra no reparadas provocan la activación de las respuestas de los puntos de control, la detención del ciclo celular y, en última instancia, la muerte de las células tumorales. Por lo tanto, la ATM se ha convertido en un atractivo punto de  
35 intervención para inhibir la reparación de rupturas de doble hebra inducidas.

El compuesto wortmanina fue uno de los inicialmente investigados en este contexto y mostró una radiosensibilización que podría atribuirse, entre otras cosas, a la inhibición de ATM. Sin embargo, no era adecuado para usos terapéuticos debido a su toxicidad *in vivo*. A partir de la estructura química del inhibidor de PI3K LY294002, KuDOS Pharmaceuticals identificó el inhibidor de ATM: KU-55933 (2-morfolino-6-(tiantren-1-il)-4H-piran-4-ona). Con este compuesto se logró la sensibilización a la radiación ionizante y a los agentes  
40 quimioterapéuticos que dañan la doble hebra del ADN (Hickson, I., et al. (2004), Cancer Res 64, 9152-9159). Sin embargo, se encontró que KU-55933 no era adecuado para uso *in vivo*, presumiblemente debido a su alta lipofilia. KU-60019 (2-((2S,6R)-2,6-dimetilmorfolino)-N-(5-(6-morfolino-4-oxo-4H-piran-2-il)-9H-tioxanten-2-il)-acetamida) y KU-559403 (2-(4-metilpiperazin-1-il)-N-[5-(6-morfolino-4-oxopiran-2-il)tioxanten-2-il]acetamida) se desarrollaron  
45 posteriormente, y KU-559403 fue aclamado lo suficientemente prometedor como para entrar en un ensayo clínico para el tratamiento de tumores sólidos avanzados.

Hay otros inhibidores de ATM que respaldan la noción anterior en el sentido de que actualmente se encuentran en desarrollo clínico, por ejemplo, AZD0156, AZD1390 y M3541, incluidos los estudios clínicos que implican su combinación con radioterapia.

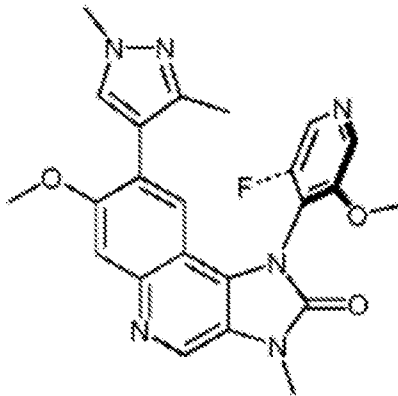
50 Si bien se ha avanzado mucho en el campo de los inhibidores de ATM, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un compuesto que tenga una alta inhibición de la ATM cinasa pero también una selectividad beneficiosa sobre otras cinasas, una biodisponibilidad beneficiosa y/o una reducción de los efectos fuera del objetivo.

Sumario de la invención

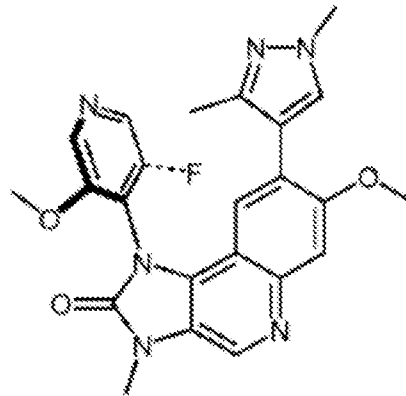
La provisión de moléculas pequeñas que inhiben, regulan y/o modulan eficazmente la transducción de señales por ATM cinasa es deseable y un objeto de la presente invención. Además, es deseable proporcionar inhibidores de ATM que sean selectivos, es decir, que no tengan o tengan una actividad significativamente menor contra otras cinasas. Además, es deseable proporcionar inhibidores de ATM que muestren propiedades beneficiosas con respecto a objetivos conocidos que provocan efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, un objeto es proporcionar compuestos que tengan efectos secundarios reducidos y/o toxicidades asociadas. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un inhibidor de ATM con buena biodisponibilidad. Es un objeto adicional o alternativo de la presente invención proporcionar un inhibidor de ATM con propiedades ventajosas en forma sólida, tales como higroscopicidad favorablemente baja y/u otras propiedades físicas.

Al menos un objeto como el descrito anteriormente y otros objetos se resuelven mediante atropisómeros y derivados deuterados del inhibidor de ATM 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluoro-5-metoxipiridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5c]quinolin-2-ona (Compuesto Y) así como formas sólidas, farmacéuticamente aceptables sales y composiciones del mismo.

Un aspecto de la invención proporciona dos compuestos, que son atropisómeros del Compuesto Y, y están representados por las fórmulas:



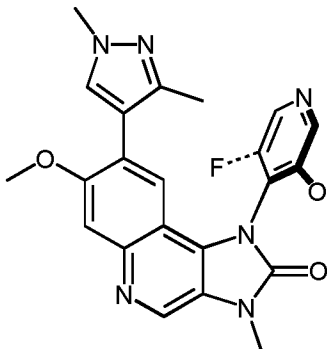
Compuesto 1



Compuesto 2

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona formas sólidas del Compuesto 1:

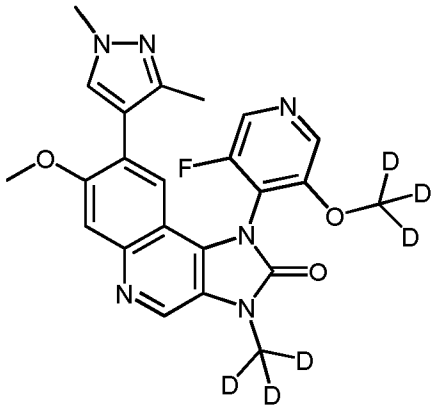


Compuesto 1

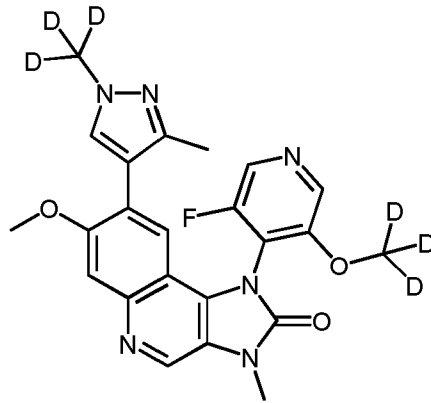
Las sales farmacéuticamente aceptables particularmente ventajosas del Compuesto 1 comprenden el Compuesto 1 fumarato, Compuesto 1 edisilato y Compuesto 1 napsilato, que también pueden denominarse colectivamente como "Compuestos 1-a" en lo sucesivo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona los atropisómeros 3-a, 3-b, 4-a, 4-b, 5-a, y 5-b de los

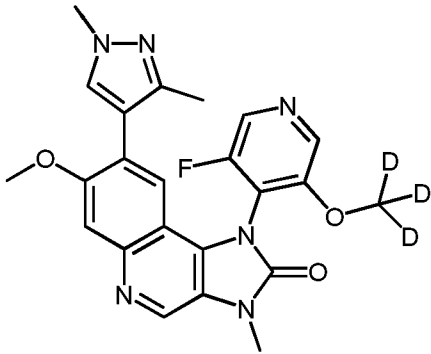
compuestos deuterados 3, 4, y 5:



Compuesto 3



Compuesto 4



Compuesto 5.

5 cuyos atropisómeros se describen e ilustran más adelante.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa un espectro de RMN  $^1\text{H}$  anotado del Compuesto 1.

La figura 2 representa un espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  anotado del Compuesto 1.

La figura 3 representa un espectro de RMN  $^{19}\text{F}$  anotado del Compuesto 1.

10 La figura 4 representa un espectro UV-Vis del Compuesto 1 en Metanol.

La figura 5 representa un cromatograma de HPLC de los Compuestos 1 y 2.

La figura 6 muestra un diagrama de flujo de la preparación del Compuesto 1.

La figura 7 representa una estructura cristalina del Compuesto-1-Dibenzoil-D-tartrato (7A) y XRPD (7B) del mismo.

La figura 8 representa una estructura cristalina del Compuesto-2-Dibenzoil-L-tartrato.

15 La figura 9 representa un gráfico del comportamiento de disolución sin hundimiento en FaSSIF del Compuesto 1 y sales específicas del mismo.

La figura 10 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de una forma sólida de fumarato del Compuesto 1.

- La figura 11 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de una forma sólida de napsilato del Compuesto 1.
- La figura 12 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de una forma sólida de edisilato del Compuesto 1.
- 5 La figura 13 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la Forma A2 sólida del Compuesto 1.
- La figura 14 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la Forma A1 sólida del Compuesto 1.
- 10 La figura 15 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la Forma A3 sólida del Compuesto 1.
- La figura 16 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la Forma NF9 sólida del Compuesto 1.
- La figura 17 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la Forma H1 sólida del Compuesto 1 hidratado.
- 15 La figura 18 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la forma H2 sólida del compuesto 1 hidratado.
- La figura 19 representa un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de la Forma NF19 sólida del Compuesto 1.
- 20 La figura 20 muestra una fuerte inhibición del crecimiento tumoral inducida por irradiación (IR) y la administración concomitante del Compuesto 1 oral (6 x 5 días, 2 Gy; Modelo de tumor FaDu SCCHN).
- La figura 21 muestra los resultados de una evaluación *in vivo* de la actividad antitumoral del Compuesto 1 y un inhibidor de ATM comparativo en combinación con olaparib, en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo derivado del paciente HBCx-10.
- La figura 22 muestra una curva de calentamiento DSC de la Forma A2 del Compuesto 1.
- 25 La figura 23 muestra una curva de calentamiento TGA de la Forma A2 del Compuesto 1.
- La figura 24 muestra una isoterma de absorción de agua DVS (25°C) de la Forma A2 del Compuesto 1.
- La figura 25 muestra una curva de calentamiento DSC de la Forma A1 del Compuesto 1.
- La figura 26 representa una curva de calentamiento TGA de la Forma A1 del Compuesto 1.
- La figura 27 muestra una isoterma de absorción de agua DVS (25°C) de la Forma A3 del Compuesto 1.
- 30 La figura 28 representa una curva de calentamiento DSC de la Forma H2 del Compuesto 1 (hidrato).
- La figura 29 muestra una curva de calentamiento TGA de la Forma H2 del Compuesto 1 (hidrato).
- La figura 30 muestra una isoterma de absorción de agua DVS (25°C) de la Forma H2 del Compuesto 1 (hidrato).
- La figura 31 representa una curva de calentamiento DSC del Fumarato del Compuesto 1 (Forma NF6).
- La figura 32 muestra una curva de calentamiento TGA del Fumarato del Compuesto 1 (Forma NF6).
- 35 La figura 33 muestra una isoterma de absorción de agua DVS (25°C) del Fumarato del Compuesto 1 (Forma NF6).
- La figura 34 representa una curva de calentamiento DSC del Napsilato del Compuesto 1 (NF7).
- La figura 35 muestra una curva de calentamiento TGA del Napsilato del Compuesto 1 (NF7)

La figura 36 representa una isoterma de absorción de agua DVS (25°C) del Napsilato del Compuesto 1 (NF7).

La figura 37 representa una curva de calentamiento DSC del Edisilato del Compuesto 1 (NF8).

La figura 38 muestra una curva de calentamiento TGA del Edisilato del Compuesto 1 (NF8).

La figura 39 representa una isoterma de absorción de agua DVS (25°C) del Edisilato del Compuesto 1 (NF8).

5 La figura 40 muestra un XRPD de un metanolato del Compuesto 1 en forma sólida S1.

La figura 41 representa un XRPD de una mezcla de hidrato/metanolato del Compuesto 1 en forma sólida S2.

La figura 42 muestra un XRPD de un solvato de THF del Compuesto 1 en forma sólida S3.

La figura 43 representa un XRPD de un solvato de dioxano del Compuesto 1 en forma sólida NF11.

La figura 44 muestra un XRPD de un solvato de cloroformo del Compuesto 1 en forma sólida NF15.

10 La figura 45 representa un XRPD de un solvato de ácido acético del Compuesto 1 en forma sólida NF16.

La figura 46 muestra un XRPD de un solvato de ácido acético del Compuesto 1 en forma sólida NF18.

La figura 47 representa un XRPD de un solvato de 1,4-dioxano del Compuesto 1 en forma sólida NF29.

La figura 48 muestra un XRPD de un solvato de diclorometano del Compuesto 1 en forma sólida NF32.

15 La figura 49 representa un XRPD de un solvato de NMP (N-metil-2-pirrolidona) del Compuesto 1 en forma sólida NF33.

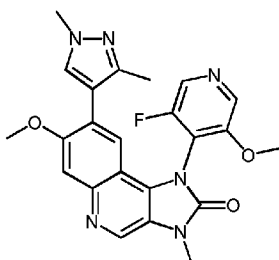
La figura 50 muestra un XRPD de un solvato de acetonitrilo del Compuesto 1 en forma sólida NF35.

La figura 51 representa un XRPD de un solvato de 1,4-dioxano del Compuesto 1 en forma sólida NF36.

La figura 52 muestra un XRPD de un solvato de dimetilacetamida del Compuesto 1 en forma sólida NF37.

Descripción detallada de la invención

20 La solicitud de patente internacional WO2016/155844 describe compuestos de imidazoloniil quinolina que inhiben, regulan y/o modulan efectivamente la transducción de señales por la ATM cinasa. Los compuestos incluyen el Compuesto Y:



Compuesto Y

25 El compuesto Y se designa como Ejemplo 4 en el documento WO2016/155844 y es activo en una variedad de ensayos y modelos terapéuticos que demuestran la inhibición selectiva de ATM cinasa sobre PI3Kalfa, PI3Kbeta, PI3Kdelta, PI3Kgamma y mTOR (en ensayos enzimáticos y celulares).

Los términos usados aquí para la definición de los compuestos se basan generalmente en las reglas de la organización IUPAC para compuestos químicos y en particular compuestos orgánicos.

30 Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que el Compuesto Y existe en forma de dos atropisómeros, que

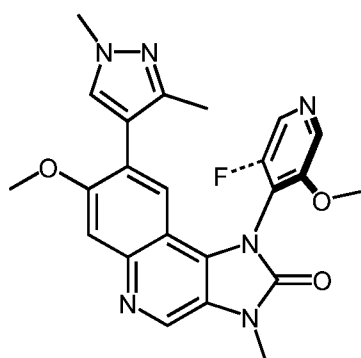
pueden aislarse y son beneficiosamente estables, y que esos atropisómeros presentan características sorprendentes y muy deseables.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona los siguientes dos compuestos, que son atropisómeros del Compuesto Y:

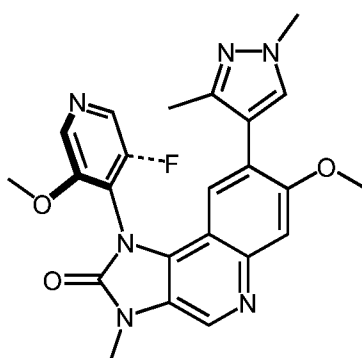
- 5 • 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1, 3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto 1) y
- 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Ra)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1, 3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto 2),

así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 Los compuestos 1 y 2 se representan por las siguientes fórmulas:



Compuesto 1



Compuesto 2

en donde las secciones en negrita y discontinua de los compuestos 1 y 2 indican la rotación parcial del anillo de piridina fuera del plano en donde está situado el anillo tricíclico.

- 15 Un experto en la técnica apreciará que el término "atropisómero" como se usa en este documento se refiere a un estereoisómero que surge debido a una rotación restringida alrededor de un enlace simple que crea un eje quiral. Se apreciará además que la barrera de rotación alrededor de esa enlace sencillo tiene que ser suficientemente alta para permitir el aislamiento de un solo atropisómero. Esa barrera de rotación puede resultar, por ejemplo, de interacciones estéricas con otros residuos de la misma molécula restringiendo así esa rotación alrededor de esa
- 20 enlace sencillo. Tanto los factores estéricos como los electrónicos entran en juego y pueden reforzarse o contrarrestarse entre sí.

- El uso de compuestos quirales que contienen átomos de carbono asimétricos está bien establecida en el descubrimiento de fármacos, en principio. En particular, se sabe en la técnica que las mezclas racémicas de dos compuestos quirales normalmente consisten en un enantiómero más activo y uno menos activo en comparación
- 25 con la mezcla racémica. Por lo tanto, el uso de solo uno de los dos enantiómeros puede ser ventajosa para mejorar la potencia global del compuesto.

- Sin embargo, el uso de atropisómeros, que son estereoisómeros que surgen solo debido a una rotación impedida alrededor de un enlace simple, generalmente se considera indeseable. En particular, los atropisómeros se consideran comúnmente como una desventaja en el descubrimiento de fármacos, ya que la estabilidad de estos
- 30 isómeros depende de las diferencias de energía que resultan de la deformación estérica u otros factores que crean una barrera a la rotación alrededor de esa enlace simple. A diferencia de los compuestos quirales que resultan de átomos de carbono asimétricos, la atropisomería no se puede predecir fácilmente. En particular, generalmente no es posible predecir fácilmente la estabilidad de un atropisómero. En particular, la altura de esa barrera energética determina el tiempo de la interconversión de dos atropisómeros correspondientes. La interconversión de un
- 35 atropisómero biológicamente activo en el otro atropisómero correspondiente puede, por lo tanto, reducir su actividad biológica e introducir efectos fuera del objetivo u otros efectos no deseados. Por lo tanto, solo los atropisómeros estables que poseen una barrera de energía suficientemente alta pueden ser adecuados en el descubrimiento de fármacos.

- Se ha descubierto sorprendentemente que los atropisómeros Compuesto 1 y Compuesto 2 no se interconvierten significativamente en el otro atropisómero respectivo, incluso después de largos períodos de tiempo de más de
- 40

diez años (una semivida rotacional de >10 diez años se determinó mediante simulaciones por computadora) y a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. Se ha evaluado que la temperatura de inversión de los atropisómeros es superior a 100°C en solución. Esta muy buena estabilidad se ha confirmado experimentalmente. Hace que esos atropisómeros sean fácilmente adecuados para la aplicación, fabricación y formulación farmacéuticas y proporciona una vida útil suficiente.

La estructura absoluta del Compuesto 1 se ha determinado basándose en la sal del ácido (2S,3S)-dibenzoil-D-tartárico, así como a partir de la difracción de rayos X de la Forma A2 sólida, que se describirá con más detalle a continuación. La estructura del Compuesto 1 ha sido probada por los resultados de espectroscopía (RMN, MS, IR y UV), difracción de rayos X, análisis elemental y polarimetría. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>19</sup>F del Compuesto 1 se muestran en las figuras 1 a 3, el espectro UV-Vis se muestra en la figura 4, El XRPD de la Forma A2 sólida del Compuesto 1 se ilustra en la figura 13. La estructura cristalina y XRPD del Compuesto-1-dibenzoil-D-tartrato se muestran en las figuras 7A y 7B, la estructura cristalina del Compuesto-2-Dibenzoil-L-tartrato se ilustra en la figura 8.

Los Compuestos 1 y 2 son inhibidores muy potentes de la ATM cinasa. Como se ilustra en la Tabla 1, el Compuesto 1 tiene evidentemente valores superiores de inhibición de ATM en todos los ensayos en comparación con el Compuesto Y, que es una mezcla de los Compuestos 1 y 2:

Tabla 1

Ensayo / IC <sub>50</sub>	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto Y
ATM (Conc. de ATP = 10 µM)	0,20 nM	0,63 nM	0,22 nM
ATM (Conc. de ATP = 1000 µM)	0,7 nM	8,8 nM	1,9 nM
pCHK2 (ATM mecanístico celular, HCT-116)	13 nM	76 nM	86 nM

Aún más, esos compuestos son selectivos sobre cinasas relacionadas, incluyendo mTOR (> 30.000 nM), DNA-PK y, más notablemente, ATR. Sorprendentemente, tanto los Compuestos 1 como 2 son inhibidores menos potentes de la cinasa ATR en comparación con el Compuesto Y, es decir, más ventajosos en términos de selectividad.

Tabla 2

Ensayo / IC <sub>50</sub>	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto Y
ATR	10.000nM	>28.000 nM	5060 nM
pCHK1 (ATR mecanístico celular, HCT-116)	> 24.000 nM	>30.000 nM	7900 nM
DNA-PK	600 nM	1290 nM	980 nM
pDNA-PK (DNA-PK mecanístico celular, HCT-116)	>30.000 nM	>30.000 nM	>30.000 nM

Si bien el Compuesto 2 no es diferente del Compuesto Y en lo que respecta a la inhibición de ATM (ver Tabla 1), tiene una selectividad significativamente mejor sobre ATR y DNA-PK que el Compuesto Y, tal como se desprende de la Tabla 2 anterior.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse de manera particularmente ventajosa para abordar de forma selectiva mecanismos de reparación de ADN específicos, en particular la recombinación homóloga, que se dirige específicamente a los daños de la doble hebra del ADN.

5 Una ventaja adicional de los inhibidores selectivos de ATM Compuestos 1 y 2 es una reducción de las toxicidades, en particular en relación con los efectos fuera del objetivo, y por tanto, la tolerabilidad de dosis de compuesto más altas. Por lo tanto, los compuestos de acuerdo con la invención abren nuevas posibilidades en la terapia del cáncer, por ejemplo, los Compuestos 1 y 2, más preferiblemente el Compuesto 1, pueden usarse en terapias de combinación dirigidas, por ejemplo, que comprenden un inhibidor de ATM potente y selectivo y un potente y otro inhibidor selectivo, por ejemplo inhibidor de ATR.

10 En general, se ha encontrado que el Compuesto 1 tiene la combinación general de propiedades más beneficiosa. Sorprendentemente, no solo tiene las mejores propiedades inhibitoras de ATM, sino también los mejores valores de aclaramiento microsómico y la inhibición más baja de la fosfodiesterasa (PDE) 2A1, así como de PDE4A1A y PDE4D2. La inhibición de la fosfodiesterasa en sí misma está asociada con una variedad de efectos farmacológicos, y los inhibidores de PDE están disponibles como medicamentos para el tratamiento de una diversidad de afecciones, que incluyen depresión, esclerosis múltiple y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, por nombrar solo algunas, todas las cuales constituirían efectos fuera del objetivo en el presente caso. También se sabe que la inhibición de PDE4 está asociada con el riesgo de inducir náuseas y, por lo tanto, debe evitarse. Por lo tanto, son deseables valores altos de IC50, es decir, una inhibición deficiente de estos objetivos fuera de objetivo. Como es evidente a partir de la siguiente Tabla 3, el Compuesto 1 tiene valores de IC50 para la inhibición de PDE4 que son en un factor de aproximadamente 5 más altos que los del Compuesto Y.

Tabla 3

Ensayo / IC50	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto Y
CLint (humano/rata/ratón) [µl/min/mg proteína]	<10, <10, 22	<10, <10, 103	19,19,61
PDE2A1	2,2 µM	3,9 µM	1,4 µM
PDE4A1A	5,2 µM	0,93 µM	1,1 µM
PDE4D2	3,0 µM	0,44 µM	0,6 µM

25 La Tabla 4 ilustra otros parámetros ventajosos del Compuesto 1, incluida una biodisponibilidad favorablemente alta de aproximadamente 80% y propiedades favorables con respecto a CYP y hERG (canal de iones cardíacos), lo último que indica que no hay interacciones relevantes para la seguridad con el canal de iones de hERG Kv11.1 cardíaco son de esperar.

Tabla 4

	Compuesto 1
K <sub>i</sub> Kv11.1 hERG canal iónico cardíaco (pinza de parche)	> 30 µM
Inhibición de CYP	> 20 µM
Biodisponibilidad (parámetro humano predicho)	~80%

30 Además, se encontró sorprendentemente que tanto el Compuesto 1 como el 2 muestran una solubilidad significativamente mejorada en soluciones amortiguador biológicas (ver Tabla 5 a continuación) en comparación con el Compuesto Y. El aclaramiento plasmático humano lento previsto y la alta biodisponibilidad del Compuesto 1 contribuyen a los requisitos apropiados de dosis bajas.

Tabla 5

Solubilidad	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto Y
PBS, pH 7,4	- 100 µg/ml	- 100 µg/ml	19 µg/ml
FaSSiF, pH 6,5	242 µg/ml	216 µg/ml	52 µg/ml
FeSSiF, pH 5,0	731 µg/ml	- 800 µg/ml	201 µg/ml

Las estructuras representadas para los Compuestos 1 o 2 pretenden incluir compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, H, C, N, en cada caso también incluyen los isótopos más pesados de estos átomos. Esto se aplica, en particular, al H, en donde se puede emplear ventajosamente deuterio o tritio, y a la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido con <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C que también está dentro del alcance de esta invención. En ciertas realizaciones preferidas, no se usan átomos enriquecidos isotópicamente, en su lugar, los átomos se usan en sus formas naturales con respecto a la distribución de isótopos.

Se considerará que la referencia a compuestos o sales de acuerdo con la presente invención también incluye formas solvatadas, es decir, solvatos de los mismos, es decir, solvatos tanto de la forma libre como de una sal. Se considera que los solvatos significan aductos de moléculas de solvente inertes sobre los compuestos que se forman debido a su fuerza de atracción mutua. Los solvatos son, por ejemplo, mono o dihidratos o alcoholatos. Las realizaciones ejemplares de solvatos se describen con más detalle a continuación.

Como se expuso anteriormente, la presente invención proporciona dos atropisómeros estables, los Compuestos 1 y 2, La preparación de estos dos atropisómeros se basa típicamente en técnicas de separación y purificación, tal como se describirá con más detalle a continuación. El experto en la técnica apreciará que esto puede no producir productos perfectamente puros. Sin embargo, la presente invención proporciona el Compuesto 1 sustancialmente libre de Compuesto 2 y el Compuesto 2 sustancialmente libre de Compuesto 1, "Sustancialmente libre" en el presente contexto significará preferiblemente que el Compuesto 1 sustancialmente puro puede contener como máximo un 20% en peso de Compuesto 2 o sal del mismo, preferiblemente como máximo 15% en peso, más preferiblemente como máximo 10% en peso, por ejemplo como máximo 5% en peso, tal como máximo 2,5% en peso, tal como máximo 1% en peso, tal como máximo 0,5% en peso o como máximo 0,1% en peso del Compuesto 2 o sal del mismo, en donde el resto hasta el 100% está compuesto por el Compuesto 1, En un ejemplo, el Compuesto 1 sustancialmente puro puede consistir en el 99% en peso del Compuesto 1 y el 1% en peso de Compuesto 2, Lo mismo se aplica viceversa al Compuesto 2, es decir, que el Compuesto 2 esté sustancialmente libre de Compuesto 1 significará preferiblemente que el Compuesto 2 puro puede contener como máximo un 20% en peso de Compuesto 1 o una sal del mismo, con los intervalos preferidos descritos para el Compuesto 1 siendo igualmente aplicable (viceversa) por analogía. Además, la referencia al Compuesto 1 o una sal del mismo, respectivamente el Compuesto 2 o una sal del mismo, incluirá todos los solvatos y formas sólidas, tales como las descritas en el presente documento más adelante, incluso sin mención específica, a menos que se describa explícitamente de otro modo.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona el Compuesto 1 o 2 sustancialmente libre de impurezas. Como se usa en este documento, el término "sustancialmente libre de impurezas" significa que el compuesto no contendrá ninguna cantidad significativa de materia extraña. Esa materia extraña puede incluir el Compuesto 1 residual o una sal del mismo, el Compuesto 2 residual o una sal del mismo, solventes residuales o cualquier otra impureza que pueda resultar de la preparación y/o aislamiento del Compuesto 1 o 2, En ciertas realizaciones, el Compuesto 1 no puede contener más del 30% en peso de materias extrañas, el resto hasta el 100% en peso está compuesto por el Compuesto 1, preferiblemente no más del 25% en peso, no más del 20% en peso, no más del 15% en peso, no más del 10% en peso, no más del 7,5% en peso, no más del 5% en peso, no más del 1% en peso, no más del 0,5% en peso o no más del 0,1% en peso. Las mismas realizaciones ejemplares son válidas, por analogía, para el Compuesto 2, Además, como antes, la referencia al Compuesto 1 o sal del mismo, respectivamente Compuesto 2 o sal del mismo, incluirá todos los solvatos y formas sólidas, tales como las descritas aquí más adelante, a menos que se describa explícitamente lo contrario.

De acuerdo con otra realización, el Compuesto 1 o 2, respectivamente, no contiene más de aproximadamente 5,0 por ciento de área de HPLC de impurezas orgánicas totales y, en ciertas realizaciones, no más de aproximadamente 3,0 por ciento de área de HPLC de impurezas orgánicas totales y, en ciertas realizaciones, no más de aproximadamente 1,5 por ciento de área de impurezas orgánicas totales de HPLC en relación con el área total del cromatograma de HPLC. En otras realizaciones, el Compuesto 1 o 2 no contiene más de aproximadamente 1,0 por ciento de área de HPLC de cualquier impureza individual; no más de aproximadamente 0,6 por ciento de área de HPLC de cualquier impureza individual y, en ciertas realizaciones, no más de aproximadamente 0,5 por ciento de área de HPLC de cualquier impureza individual, con respecto al área total del cromatograma de HPLC. Por ejemplo, para el cromatograma de HPLC, puede usarse el método descrito en el Ejemplo 3,3 para el análisis

de la pureza de los respectivos atropisómeros. De nuevo, la referencia al Compuesto 1 o una sal del mismo, respectivamente el Compuesto 2 o una sal del mismo, incluirá todos los solvatos y formas sólidas, tales como las descritas en el presente documento más adelante, a menos que se describa explícitamente de otro modo.

5 De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización alternativa, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz del Compuesto 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar tales composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, una composición que puede incluir una cantidad eficaz de Compuesto 1 o 2). La referencia al Compuesto 1 o 2 se leerá en el presente contexto de manera que cualquier cantidad del otro atropisómero respectivo solo pueda equivaler a la que esté en armonía con las definiciones de "sustancialmente libre de" el otro atropisómero respectivo, "sustancialmente libre de impurezas" o cantidad total de impurezas, respectivamente, es decir, contará para la cantidad del compuesto mencionado en lugar de estar presente por separado. Lo mismo se aplica a las respectivas sales. Como se expuso anteriormente, la referencia al Compuesto 1 o 2 o una sal del mismo incluirá igualmente cualquier forma sólida o solvato, tal como los que se describen más adelante en el presente documento, a menos que se describa específicamente lo contrario. En realizaciones ejemplares, el Compuesto 1 está contenido en la composición farmacéutica en su forma libre, es decir, no de sal.

20 De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición (farmacéutica) de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto o composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, para su uso como medicamento, en particular para el tratamiento del cáncer. De nuevo, la referencia a un compuesto o sal del mismo incluirá cualquier solvato o forma sólida de esos compuestos o sales, tales como los descritos en el presente documento más adelante, a menos que se describa explícitamente de otro modo.

#### 25 Forma libre y sales

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden usar en su forma libre, es decir, tal como se muestra en las fórmulas anteriores. Por ejemplo, se ha descubierto que la forma libre del Compuesto 1 es particularmente beneficiosa, y formas sólidas ejemplares del mismo, incluida una forma sólida preferida, se describirán con más detalle a continuación.

30 Por otro lado, la presente invención también abarca el uso de estos compuestos en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, que pueden derivarse de diversos ácidos orgánicos e inorgánicos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante métodos convencionales. Un compuesto de acuerdo con la invención se puede convertir en la sal de adición de ácido asociada usando un ácido, por ejemplo, mediante la reacción del compuesto y una cantidad equivalente o en exceso de ácido en un solvente adecuado, tal como, por ejemplo, THF o acetona seguido por cristalización por enfriamiento de la solución saturada así formada. Como alternativa, se puede emplear cristalización antisolvente o cristalización por evaporación.

40 Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de acuerdo con la presente invención, en particular el Compuesto 1, incluyen una sal de HCl, sal de sulfato, sal de tosilato, sal de besilato, sal de lactato, en particular sal de L-lactato.

Las sales preferidas del Compuesto 1 incluyen una sal fumarato, una sal napsilato y una sal edisilato, que también pueden denominarse colectivamente Compuestos 1a a continuación.

45 El napsilato del Compuesto 1 se puede preparar a partir del Compuesto 1 usando ácido naftalensulfónico y THF o acetona como solvente. Se obtuvo una buena cristalinidad. La proporción preferida de Compuesto 1 : napsilato es de aproximadamente 1:1.

El edisilato del Compuesto 1 se puede obtener usando ácido etanodisulfónico y cristalización por enfriamiento en acetona. La proporción preferida de Compuesto 1 : napsilato es de aproximadamente 1:1, Se obtuvo una buena cristalinidad.

50 El fumarato del Compuesto 1 puede obtenerse mediante difusión de vapor antisolvente en THF usando n-pentano como antisolvente y ácido fumárico como ácido. Se demostró que la relación de Compuesto 1 : fumarato era aproximadamente 1: 0,9, La sal resultante tiene propiedades físicas generales muy favorables y buena cristalinidad. La sal fumarato es una realización preferida entre las sales, en parte debido a la deseable ausencia de propiedades higroscópicas.

En el Ejemplo 5 se describen ejemplos detallados de métodos adecuados para preparar las sales fumarato, napsilato y edisilato del Compuesto 1 de acuerdo con la presente invención.

5 Se ha encontrado que estas sales del Compuesto 1 muestran una velocidad de disolución inicial más rápida que el Compuesto 1 original. El comportamiento de disolución sin hundimiento en la solución amortiguador FaSSiF (pH 6,5) del Compuesto 1 y las sales específicas del mismo se representa a modo de ejemplo en la figura 9, Las sales con un comportamiento de disolución ventajoso son el edisilato del Compuesto 1, el fumarato del Compuesto 1 y el napsilato del Compuesto 1, El Compuesto 1 original se usó en forma de una mezcla de diversas formas cristalinas y solvatadas.

10 Un experto en la técnica apreciará que el resto aniónico del ácido y el Compuesto 1 están unidos iónicamente para formar el Compuesto 1-a. Se contempla que el Compuesto 1-a puede existir en una variedad de formas físicas. Por ejemplo, el Compuesto 1-a puede estar en solución, suspensión o en forma sólida. En determinadas realizaciones, el Compuesto 1-a está en forma sólida. Cuando el Compuesto 1-a está en forma sólida, esa compuesto puede ser amorfo, cristalino o una mezcla de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "polimorfo" se refiere a las diferentes estructuras cristalinas en las que puede cristalizar un compuesto o una sal del mismo.

15 En algunas realizaciones, los Compuestos 1-a son sólidos cristalinos sustancialmente libres de Compuesto 1-a amorfo. Como se usa en este documento, el término "sustancialmente libre de Compuesto 1-a amorfo" significa que la sal no contiene una cantidad significativa de Compuesto 1-a amorfo. En determinadas realizaciones, está presente al menos aproximadamente 90% en peso del Compuesto 1-a cristalino, o está presente al menos aproximadamente 95% en peso del Compuesto 1-a cristalino. En otras realizaciones más de la invención, está presente al menos aproximadamente 99% en peso del Compuesto 1-a cristalino. Estos porcentajes son relativos al peso absoluto del Compuesto 1-a (100% en peso).

20 En una realización ejemplar, la presente invención proporciona una forma sólida de fumarato del Compuesto 1, caracterizada por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 10 y/o caracterizada por uno o más picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionado de aquellos de aproximadamente

Sal fumarato	
Pico No.	°2-Theta
1	8
2	9,4*
3	10,3*
4	10,9
5	11,6
6	12,1*
7	14,1
8	14,9*
9	15,8*
10	16,7

Sal fumarato	
Pico No.	°2-Theta
11	18,2
12	19
13	19,8
14	20,4
15	21,3
16	21,9
17	22,6
18	23,8*
19	24,4
20	25,1*

Sal fumarato	
Pico No.	°2-Theta
21	25,7
22	26,6

30 La sal fumarato del Compuesto 1 es anhidra. Su forma sólida también puede denominarse Fumarato-NF6. La curva de calentamiento DSC, la curva de calentamiento TGA y la isoterma de absorción de agua DVS (25°C) de Fumarato-NF6 se muestran en las figuras 31, 32 y 33. Los resultados de las mediciones de disolución sin hundimiento se proporcionan en la siguiente tabla (datos de disolución sin hundimiento) en FaSSiF a pH 6,5, método descrito en la Sección Experimental):

## ES 2 984 074 T3

Tiempo (min)	Conc. de fumarato (NF6) disuelta
5	150,9 µg/mL
15	251,7 µg/mL
30	257,0 µg/mL
60	245,8 µg/mL
120	232,2 µg/mL

Como se usa en este documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor de grado 2-theta se refiere al valor establecido  $\pm 0,3$  grados 2-theta ( $^{\circ}2\theta$ ). En ciertas realizaciones, "aproximadamente" se refiere a  $\pm 0,2$  grados 2-theta o  $\pm 0,1$  grados 2-theta, lo más preferiblemente  $\pm 0,2$  grados 2-theta.

- 5 Cualquier polimorfo de forma sólida, respectivamente, descrito en este documento se puede caracterizar por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más de los picos de XRD o XRPD ( $^{\circ}2\theta$ ). Cualquier polimorfo de forma sólida y respectivamente descrito en el presente documento se caracteriza preferiblemente por al menos seis picos XRD ( $^{\circ}2\theta$ , preferiblemente  $\pm 0,2$   $^{\circ}2\theta$ ). Los picos preferidos para la caracterización de la forma sólida respectivamente
- 10 polimorfo se indican mediante letras en negrita y asteriscos en los respectivos listados de picos.

En una realización ejemplar adicional, la presente invención proporciona una forma sólida de napsilato del Compuesto 1, caracterizada por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 11 y/o caracterizada por uno o más picos en su patrón de difracción de rayos en polvo seleccionado de aquellos de aproximadamente

Sal napsilato	
Pico No.	$^{\circ}2$ -Theta
1	7*
2	8,2*
3	9,2
4	10,3*
5	12,9*
6	13,8
7	14,5
8	15,7*
9	16,6*
10	18,8

Sal napsilato	
Pico No.	$^{\circ}2$ -Theta
11	19,7
12	20,2
13	21,3
14	21,7
15	23,9
16	24,3
17	24,9

15

Las propiedades de adsorción térmica y de agua de la sal napsilato del Compuesto 1 se ilustran en las figuras 34, 35 y 36. La forma sólida obtenida para la sal napsilato también puede denominarse Napsilato NF7. Además, el comportamiento de disolución está representado por los siguientes datos experimentales de disolución sin hundimiento (FaSSiF, pH 6,5):

## ES 2 984 074 T3

Tiempo (min)	Conc. de napsilato disuelta
5	167,4 µg/mL
15	310,6 µg/mL
30	331,4 µg/mL
60	329,7 µg/mL
120	326,0 µg/mL

5 En una realización ejemplar adicional, la presente invención proporciona una forma sólida de edisilato del Compuesto 1, caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 12 y/o caracterizado por uno o más picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionado de aquellos de aproximadamente

Sal edisilato	
Pico No.	°2-Theta
1	7*
2	12,3*
3	12,8
4	13,4
5	14,1
6	16,2
7	17*
8	18*
9	18,7
10	19,7

Sal edisilato	
Pico No.	°2-Theta
11	21,4
12	21,9*
13	23,1
14	24,2
15	24,7*
16	26,2
17	27

10

15

Las propiedades térmicas y los datos de disolución de la sal edisilato del Compuesto 1 se

20 ilustran en las figuras 37, 38 y 39. La forma sólida de la sal edisilato también puede denominarse NF8. Es una forma/sal anhidra. Los datos de disolución sin hundimiento (FaSSiF, pH 6,5) se proporcionan en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	Conc. de sal edisilato disuelta
5	274,5 µg/mL
15	276,0 µg/mL
30	269,2 µg/mL
60	276,5 µg/mL
120	274,7 µg/mL

25 En armonía con lo expuesto anteriormente con respecto a los Compuestos 1 y 2, la presente invención proporciona el Compuesto 1-a u otras sales del Compuesto 1 sustancialmente libres de Compuesto 2 o sal del mismo. En realizaciones adicionales, el Compuesto 1-a u otra sal del Compuesto 1 también se proporciona sustancialmente

5 libre de impurezas. De acuerdo con otra realización, el Compuesto 1-a o cualquier otra sal del Compuesto 1 no contiene más de aproximadamente 5,0 por ciento de área de HPLC de impurezas orgánicas totales con respecto al área total del cromatograma de HPLC. Los intervalos ejemplares y preferidos descritos anteriormente para el Compuesto 1 en relación con "sustancialmente libre de Compuesto 2 o una sal del mismo", "libre de impurezas" y el porcentaje de área de las impurezas orgánicas totales son igualmente aplicables aquí. Lo mismo se aplica, por analogía, a cualquiera de las sales de cualquiera de los compuestos, y en particular a los compuestos atropisoméricos, de acuerdo con la presente invención.

10 De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un Compuesto 1-a. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar tales composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, una composición que puede incluir una cantidad eficaz del Compuesto 1-a). Aún otra realización proporciona el Compuesto 1-a, respectivamente, una composición de este de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento de cáncer. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona el uso de una composición descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. El Compuesto 1-a puede estar presente en la composición (farmacéutica) en las mismas cantidades descritas para el Compuesto 1, Con respecto a la presencia del otro atropisómero o sal del mismo en la composición, respectivamente, las consideraciones expuestas anteriormente para el Compuesto 1 se aplican igualmente por analogía.

#### Formas sólidas y solvatos

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona formas sólidas del Compuesto 1 o 2, en particular del Compuesto 1.

Un experto en la técnica apreciará que los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden existir en una variedad de formas físicas. Por ejemplo, pueden estar en solución, suspensión o en forma sólida.

25 En ciertas realizaciones preferidas, el Compuesto 1 está en forma sólida. Las formas sólidas se prefieren aquí generalmente porque permiten la provisión de composiciones farmacéuticas sólidas. Cuando el Compuesto 1 está en forma sólida, esa compuesto puede ser amorfo, cristalino o una mezcla de los mismos. Las formas sólidas ejemplares del Compuesto 1 se describen con más detalle a continuación.

De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona el Compuesto 1 como un sólido amorfo. Los sólidos amorfos son bien conocidos por los expertos en la técnica y normalmente se preparan mediante métodos tales como liofilización, secado por aspersión o precipitación repentina.

30 En otras realizaciones, el Compuesto 1 es un sólido cristalino. Como se usa en el presente documento, el término "polimorfo" se refiere a las diferentes estructuras cristalinas en las que puede cristalizar un compuesto.

35 En algunas realizaciones, el Compuesto 1 es un sólido cristalino sustancialmente libre de Compuesto 1 amorfo. Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente libre de Compuesto 1 amorfo" significa que el compuesto no contiene una cantidad significativa de Compuesto 1 amorfo. En ciertas realizaciones, al menos está presente aproximadamente 90% en peso del Compuesto 1 cristalino, o está presente al menos aproximadamente 95% en peso del Compuesto 1 cristalino. En otras realizaciones más de la invención, está presente al menos aproximadamente 99% en peso del Compuesto 1 cristalino. Estos porcentajes son relativos al peso absoluto del Compuesto 1 (100% en peso). Lo mismo se aplica, mutatis mutandis, al contenido amorfo aceptable en cualquier forma cristalina respectivamente polimorfo de todos los compuestos descritos en este documento, incluidos los descritos para las sales, formas anhidras, solvatos y otras formas de este documento.

45 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una forma sólida del Compuesto 1, que es una forma sólida del Compuesto 1 anhidro, preferiblemente el Compuesto 1 anhidro cristalino. Se describen en este documento cinco formas polimórficas diferentes del Compuesto 1 anhidro. En el contexto de las formas sólidas específicas descritas en esta sección que implican formas anhidras y solvatos, la referencia al Compuesto 1 debe entenderse como una referencia al compuesto como tal, es decir, su forma libre (no de sal).

Una primera forma cristalina anhidra del Compuesto 1 se denomina en lo sucesivo "Forma A2" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) sustancialmente en línea con el representado en la figura 13, y se ha encontrado que ser muy ventajoso.

50 De acuerdo con una realización, la Forma A2 se caracteriza por uno o más picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente 7,3, aproximadamente 9,6, aproximadamente 11,1, aproximadamente 12,0, aproximadamente 12,7 y aproximadamente 16,2 grados 2-theta. En algunas realizaciones, la Forma A2 se caracteriza por dos o más picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente 7,3, aproximadamente 9,6, aproximadamente 12,7,

aproximadamente 16,2, aproximadamente 22,6 y aproximadamente 25,1 grados 2-theta. En determinadas realizaciones, la Forma A2 se caracteriza por tres o más picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente 7,3, aproximadamente 9,6, aproximadamente 12,7, aproximadamente 16,2, aproximadamente 22,6 y aproximadamente 25,1 grados 2-theta. En ciertas realizaciones, la Forma A2 se caracteriza por cuatro, cinco o sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente 7,3, aproximadamente 9,6, aproximadamente 12,7, aproximadamente 16,2, aproximadamente 22,6 y aproximadamente 25,1 grados 2-theta. En realizaciones particulares, la Forma A2 se caracteriza por seis o más o sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente 7,3, 9,6, 11,1, 12,0, 12,7, 14,7, 16,2, 17,3, 18,9, 21,0, 22,6 y 25,1 grados 2-theta.

En una realización ejemplar, la Forma A2 se puede caracterizar por uno o más, preferiblemente seis y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) seleccionados de aquellos en aproximadamente:

Forma A2	
Pico No.	°2-Theta
1	7,3*
2	9,6*
3	11,1*
4	12,0*
5	12,7*
6	13,0
7	14,7
8	16,2*
9	16,9
10	17,3

Forma A2	
Pico No.	°2-Theta
11	18,9
12	19,3
13	19,7
14	20,4
15	21,0
16	21,8
17	22,1
18	22,4
19	22,6
20	23,4

Forma A2	
Pico No.	°2-Theta
21	25,1
22	25,7
23	26,4
24	28,0
25	28,3

15

20

Se apreciará que la forma polimórfica descrita anteriormente se puede caracterizar, por ejemplo, por referencia a cualquiera de los picos en su respectivo patrón de difracción de rayos X (XRD). Como se indicó anteriormente, las letras en negrita y los asteriscos designan picos que pueden ser preferidos para la caracterización de un polimorfo.

5 La Forma A2 puede estar caracterizada por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más del XRPD picos ( $^{\circ}2\theta$ ) de la tabla anterior. Cualquier polimorfo descrito en el presente documento se caracteriza preferiblemente por al menos seis picos de XRD o XRPD ( $^{\circ}2\theta$ , preferiblemente  $\pm 0,2$ ).

10 La Forma A2 se puede caracterizar opcionalmente porque tiene un sistema cristalino monoclinico y un grupo espacial P2<sub>1</sub>. La Forma A2 puede caracterizarse además por uno o más de los siguientes parámetros de su celda unitaria, tal como se establece en la siguiente tabla:

Forma A2	
$a$	7,457 Å
$b$	15,982 Å
$c$	18,246 Å
$\alpha$	90,0°
$\beta$	90,0°
$\gamma$	90,0°
$V$	2174,5 Å <sup>3</sup>

15 La Forma A2 del Compuesto 1 tiene propiedades generales favorables, tal como es más evidente por su comportamiento térmico y de absorción de agua, tal como se ilustra en la curva de calentamiento DSC de (figura 22), la curva de calentamiento TGA (figura 23) y la isoterma de absorción de agua DVS (a 25°C) (figura 24). La Forma A2 adsorbe muy poca agua (<2%) incluso hasta una humedad relativa del 100% y, por lo tanto, es superior a la Forma A3, por ejemplo.

20 Otra ventaja de la Forma A2 es su comportamiento de disolución favorable, tal como se ilustra en la siguiente tabla, que representa las cantidades de Compuesto 1 en la Forma A2 disueltas en diferentes períodos de tiempo (datos de disolución sin hundimiento en FaSSiF a pH 6,5, método descrito en la Sección Experimental):

Tiempo (min)	Conc. de Forma A2 disuelta
5	163,4 µg/mL
15	204,4 µg/mL
30	233,2 µg/mL
60	233,3 µg/mL
120	224,0 µg/mL

La Forma A2 se puede obtener a partir del Compuesto 1 mediante cristalización por enfriamiento en alcoholes, por nombrar sólo un ejemplo. Los métodos y condiciones de reacción adecuados se describen en detalle en el Ejemplo 7.

25 Por ejemplo, los cristales de la Forma A2 que tienen propiedades favorables se pueden preparar de forma reproducible mediante un proceso de cristalización controlado que comprende:

a) Preparar una dispersión del Compuesto 1, por ejemplo, el hidrato del Compuesto 1, tal como el hidrato del

Compuesto 1 en forma H2, en un solvente adecuado, por ejemplo, un alcohol,

b) Calentar la dispersión para obtener una solución, preferiblemente una solución clara,

c) Refrigeración controlada de la solución,

d) Adición de cristales semilla de la Forma A2.

- 5 e) Enfriamiento controlado de la solución con los cristales de siembra, por ejemplo a una velocidad de aproximadamente 0,1°C/min.

10 Los alcoholes adecuados y las condiciones de cristalización, tales como temperaturas, pueden derivarse de los EJEMPLOS 7.1 a 7.3, que son aplicables más allá de la realización específica. La presente invención se refiere además al Compuesto 1 cristalino anhidro en la Forma A2, que se puede obtener mediante el proceso anterior o sustancialmente en línea con cualquiera de los procesos descritos en los EJEMPLOS 7.1 a 7.4.

Una forma cristalina anhidra adicional del Compuesto 1 se denomina en lo sucesivo "Forma A1" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 14. Los métodos adecuados para su preparación se describen en el Ejemplo 7.

- 15 La Forma A1 se puede caracterizar por uno o más, preferiblemente seis, y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente:

Forma A1	
Pico No.	°2-Theta
1	7,7*
2	8,3*
3	9,6
4	10,3*
5	12,9*
6	14,5*
7	15,3
8	16,1
9	18,9*
10	19,6

Forma A1	
Pico No.	°2-Theta
11	21,2
12	21,7
13	24,3
14	25,6*
15	26
16	26,3
17	27,3

20

Las propiedades térmicas de la Forma A1 del Compuesto 1 se evaluaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA), tal como se ilustra en las figuras 25 y 26.

## ES 2 984 074 T3

Una tercera forma cristalina anhidra del Compuesto 1 se denomina en lo sucesivo "Forma A3" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 15, Un método adecuado para su preparación se describe en el Ejemplo 7.

- 5 La Forma A3 se puede caracterizar por uno o más, preferiblemente seis, y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos de aproximadamente:

Forma A3	
Pico No.	°2-Theta
1	9,3*
2	11,2
3	12
4	14,7*
5	15,8
6	16,7*
7	18,6*
8	19,4*
9	21,3
10	23,2*

Forma A3	
Pico No.	°2-Theta
11	24,6
12	25,3
13	27,5

10

15

- 20 Como es evidente en la figura 27, la Forma A3 del Compuesto 1 muestra muy poca adsorción de agua hasta una humedad relativa de aproximadamente 70%. Opcionalmente, la Forma A3 puede caracterizarse adicionalmente por el sistema de cristal y los parámetros de la celda unitaria como se establece en la Tabla 7 a continuación. Los datos de disolución sin hundimiento en FaSSIF a pH 6,5 del Compuesto 1 en la Forma A3 se dan en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	Conc. de Forma A3 disuelta
5	135,6 µg/mL
15	160,8 µg/mL
30	190,3 µg/mL
60	212,9 µg/mL
120	219,7 µg/mL

- 25 Una cuarta forma cristalina anhidra del Compuesto 1 se denomina a continuación "Forma NF9" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 16. Un método adecuado para su preparación se describe en el Ejemplo 7.

La forma NF9 puede caracterizarse por uno o más, preferiblemente seis y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos en aproximadamente:

## ES 2 984 074 T3

Forma NF9	
Pico No.	°2-Theta
1	7,2*
2	8,7*
3	8,9*
4	12,2
5	16,1*
6	16,6*
7	16,8
8	17,5
9	20,1
10	21,5*

Forma NF9	
Pico No.	°2-Theta
11	23,9
12	24,3
13	24,5
14	27

- 5 En una realización adicional, la presente invención proporciona hidratos del Compuesto 1, preferiblemente una forma sólida del hidrato del Compuesto 1, preferiblemente el Compuesto 1 cristalino hidratado. En este documento se describen dos hidratos diferentes, respectivamente, formas polimórficas de los hidratos del Compuesto 1, Tal como se mencionó anteriormente, en el contexto de estas formas sólidas específicas, la referencia al Compuesto 1 debe entenderse como una referencia al compuesto como tal, es decir, su forma libre (no de sal).

Una primera forma cristalina de un hidrato del Compuesto 1 se denomina en lo sucesivo "Forma H1" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 17. Los métodos adecuados para su preparación se describen en el Ejemplo 7.

- 10 La forma H1 puede caracterizarse por uno o más, preferiblemente seis y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos en aproximadamente:

Forma H1	
Pico No.	°2-Theta
1	7,2*
2	8,7*
3	8,9*
4	12,2
5	13,5
6	14,1
7	15,9
8	16,1*

Forma H1	
Pico No.	°2-Theta
11	17,5
12	21,5*
13	23,8
14	24,2
15	24,4
16	26,5
17	27

## ES 2 984 074 T3

Forma H1	
Pico No.	°2-Theta
9	16,6*
10	16,8

Forma H1	
Pico No.	°2-Theta

Una segunda forma cristalina de un hidrato del Compuesto 1 se denomina en lo sucesivo "Forma H2" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 18. Los métodos adecuados para su preparación se describen en el Ejemplo 7.

- 5 La forma H2 puede caracterizarse por uno o más, preferiblemente seis y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos en aproximadamente:

El hidrato del Compuesto 1 en Forma H2 cristalina se puede caracterizar opcionalmente porque tiene un sistema cristalino triclinico y un grupo espacial P1. La forma H2 puede caracterizarse por uno o más de los siguientes parámetros de su celda unitaria, tal como se establece en la Tabla 7 a continuación.

Forma H2	
Pico No.	°2-Theta
1	7,2*
2	8,7*
3	10,3*
4	13,1*
5	13,6
6	14,2*
7	15,8*
8	17,3
9	18,8
10	20,1

Forma H2	
Pico No.	°2-Theta
11	20,9*
12	21,8
13	22,3
14	23
15	23,8
16	24,7
17	25,3
18	26,4
19	27,2
20	27,8

Forma H2	
Pico No.	°2-Theta
21	29

10

Las propiedades de adsorción térmica y de agua de la Forma H2 se ilustran en las figuras 28, 29 y 30. Se determinó que los datos de disolución sin hundimiento en FaSSiF (ph 6,5) para la Forma H2 del Compuesto 1 son los siguientes:

Tiempo (min)	Conc. de Forma H2 disuelta
5	42,7 µg/mL
15	78,8 µg/mL
30	140,8 µg/mL
60	200,5 µg/mL

120	218,3 µg/mL
-----	-------------

Una quinta forma cristalina del Compuesto 1 anhidro se denomina a continuación "Forma NF19" y es un polimorfo caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente en línea con el representado en la figura 19. Los métodos adecuados para su preparación se describen en el Ejemplo 7.

- 5 La forma NF19 puede caracterizarse por uno o más, preferiblemente seis y hasta sustancialmente todos los picos en su patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionados de aquellos en aproximadamente:

Forma NF19	
Pico No.	°2-Theta
1	6,9
2	7,1
3	9,5
4	11,4
5	12,8
6	13,7
7	13,9
8	14,2
9	16,3
10	16,7

Forma NF19	
Pico No.	°2-Theta
11	18,8
12	19,4
13	20,2
14	20,8
15	21
16	21,9
17	22,9
18	23,4
19	24,1
20	25

Forma NF19	
Pico No.	°2-Theta
21	26,9
22	27,3
23	27,5
24	28,7

- 10 Las formas sólidas A1, A3, H1 y H2 también pueden, o como alternativa, caracterizarse por tener un determinado sistema cristalino, grupo espacial y/o parámetro de celda unitaria seleccionado entre a, b, c,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y V, tal como se establece a continuación en la Tabla 7:

Tabla 7

	Forma A1	Forma A3	Forma H1	Forma H2
Temp. de medición	298 K	298 K	298 K	200 K
Sistema de cristales	triclinico	triclinico	Triclinico	triclinico
Grupo espacial	P1	P1	P2i	P1
$\alpha$	8,940 Å	10,553 Å	13,206 Å	8,542 Å
b	11,022 Å	10,984 Å	8,697 Å	11,249 Å
c	12,509 Å	11,530 Å	20,791 Å	13,150 Å
$\alpha$	106,1°	112,8°	90,0°	67,3°
$\beta$	107,4°	112,8°	102,8°	89,8°

## ES 2 984 074 T3

$\gamma$	90,1°	93,7°	90,0°	83,3°
V	1125,7 Å <sup>3</sup>	1099,2 Å <sup>3</sup>	2328,0 Å <sup>3</sup>	1156,6 Å <sup>3</sup>

La presente invención también se refiere a las siguientes formas de solvatos, que pueden prepararse fácilmente por cristalización de los respectivos solventes, pero se ha encontrado que son considerablemente menos ventajosas con respecto a propiedades importantes en comparación con las formas anteriores:

- 5 Un metanolato del Compuesto 1 (forma sólida denominada S1), una mezcla de hidrato/metanolato del Compuesto 1 (forma sólida denominada S2), un solvato de THF del Compuesto 1 (forma sólida denominada S3), formas de solvato de 1,4-dioxano del Compuesto 1 en numerosas formas sólidas (formas sólidas denominadas NF11 [del experimento de conversión de suspensión de forma anhidra a ~26 mg/200  $\mu$ L en 1,4-dioxano a TA], NF29 [del experimento de cristalización con enfriamiento 50-5°C en 1,4-dioxano], NF36 [del experimento de conversión de suspensión de forma anhidra a ~52 mg/150  $\mu$ L en 1,4-dioxano a TA]), un solvato de cloroformo del Compuesto 1 (forma sólida denominada NF15), solvato de ácido acético formas del Compuesto 1 en varias formas sólidas (formas sólidas denominadas NF16 [del experimento de cristalización por evaporación a TA en ácido acético], NF18 [del experimento de cristalización por evaporación a 50°C en ácido acético]), un solvato de diclorometano (DCM) del Compuesto 1 (forma sólida denominada NF32), un solvato de NMP (N-Metil-2-pirrolidona) del Compuesto 1 (forma sólida denominada NF33), un solvato de acetonitrilo del Compuesto 1 (forma sólida denominada NF35), un solvato de dimetilacetamida (DMAA) del Compuesto 1 (forma sólida denominada NF37). Los XRPDs de las formas sólidas de estos solvatos se muestran en las figuras 40 a 52, y los picos correspondientes se enumeran en las siguientes tablas:

Pico Núm.	2 $\theta$							
	S1	S2	S3	NF11	NF15	NF16	NF18	NF29
1	7,2	8,3	7,5	7,9	7,9	6,8	6,8	7,9
2	8,7	9,8	8,0	8,1	9,4	8,5	6,9	9,6
3	12,5	10,2	10,3	8,6	9,6	8,7	8,5	10,7
4	13,6	12,6	14,6	10,3	10,8	11,9	8,7	10,9
5	14,2	13,5	15,0	11,7	11,5	14,7	9,4	13,5
6	15,5	14,1	15,4	12,1	12,4	15,4	11,9	13,7
7	15,9	14,9	18,7	12,3	12,8	16,4	14,7	14,5
8	16,4	16,8	21,4	13,1	14,2	17,0	15,4	15,3
9	16,8	19,0	22,0	16,5	14,6	17,8	16,4	15,8
10	19,9	20,5	22,6	16,7	15,2	18,4	17,8	16,2
11	20,7	21,0	23,6	16,9	15,7	18,9	18,4	17,5
12	21,6	22,2	29,6	19,6	16,6	20,0	18,9	17,9
13	23,2	24,2		20,1	19,3	20,4	20,0	19,3
14	23,5	24,8		20,6	20,4	23,3	20,4	21,4
15	24,2	25,8		21,1	21,6	24,7	23,3	22,0
16	24,6	26,2		21,8	22,9	25,0	24,7	22,4

## ES 2 984 074 T3

17	25,0	26,5		23,8	24,1	25,7	25,0	23,2
18	25,8	27,2		24,3	24,6	26,5	25,7	23,5
19	27,1	27,6		24,8	26,6	27,2	26,5	24,8
20	28,8	28,4		27,5	28,3	28,4	27,2	25,4

Pico Núm.	20				
	NF32	NF33	NF35	NF36	NF37
1	7,2	7,6	7,0	7,9	7,4
2	8,9	13,4	8,4	9,6	9,7
3	9,4	13,8	9,3	10,7	11,2
4	10,0	16,3	10,3	10,9	12,1
5	10,7	17,2	12,5	13,7	12,8
6	11,6	17,8	12,8	14,5	13,1
7	13,4	21,5	13,6	15,4	14,7
8	14,4	21,9	14,0	15,8	16,3
9	14,8	22,7	14,3	16,2	17,3
10	16,7	23,5	15,3	17,9	18,7
11	18,9	24,3	16,4	19,2	18,9
12	21,5	25,2	16,9	22,0	20,5
13	21,7	27,4	19,0	22,4	21,0
14	22,1		20,0	22,9	22,4
15	23,2		20,2	23,2	22,7
16	24,6		21,0	23,5	23,4
17	25,5		24,4	24,9	25,2
18	26,6		25,6	25,4	25,3
19	27,1		26,5		25,7
20	28,4		27,5		28,1

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de Compuesto 1 en la Forma A2, que es la forma sólida preferida. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar esas composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz

del Compuesto 1 en la Forma A2. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona el uso de un Compuesto 1 en la Forma A2 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En una realización adicional, la presente invención proporciona la Forma A2 para su uso como medicamento, preferiblemente para el tratamiento del cáncer. En armonía con lo que se ha establecido anteriormente, las realizaciones, intervalos, purzas, etc. ejemplares descritos para el Compuesto 1 son igualmente válidos para la Forma A2.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de Compuesto 1 en cualquiera de las formas sólidas de Compuesto 1 anhidro o Compuesto 1 hidratado como se describió anteriormente. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar esas composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz del Compuesto 1 en una de esas formas sólidas. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona el uso de un Compuesto 1 en forma sólida como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. En una realización adicional, la presente invención proporciona una forma sólida del Compuesto 1 como se describe en el presente documento para su uso como medicamento, preferiblemente para el tratamiento del cáncer. En armonía con lo expuesto anteriormente, las realizaciones, intervalos, purzas, etc. ejemplares descritos para el Compuesto 1 son igualmente válidos para las formas sólidas.

La presente invención también se refiere a una forma sólida de Compuesto 1 anhidro o Compuesto 1 hidratado, tal como se describe en el presente documento, que se obtiene o puede obtenerse de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo 7.

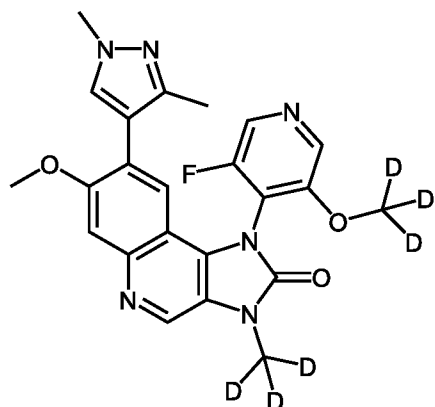
#### Realizaciones deuteradas

Los derivados deuterados del compuesto Y son los siguientes:

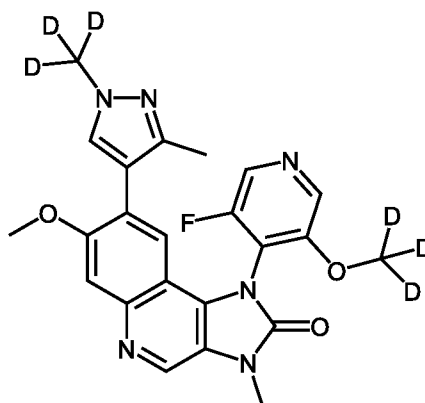
- 8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-(trideuterio-metil)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto 3) y
- 1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-metil-8-[3-metil-(trideuterio-metil)pirazol-4-il]imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto 4),
- 8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (Compuesto 5),

así como sus sales.

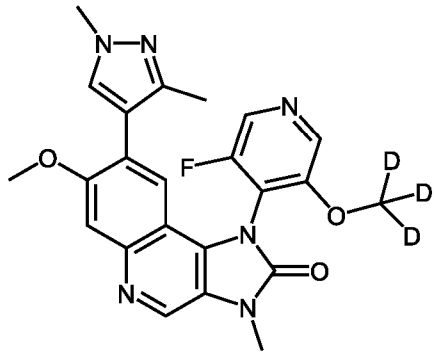
Los compuestos 3, 4 y 5 se representan por las siguientes fórmulas y se proporcionan como ejemplos de referencia, respectivamente, para preparar los respectivos atropisómeros:



Compuesto 3

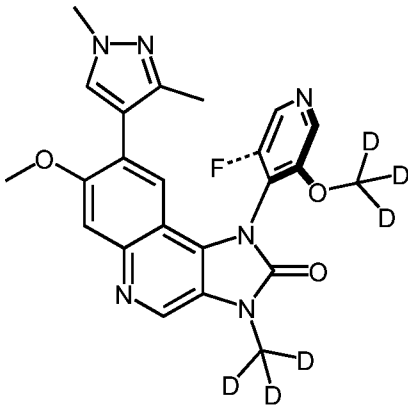


Compuesto 4

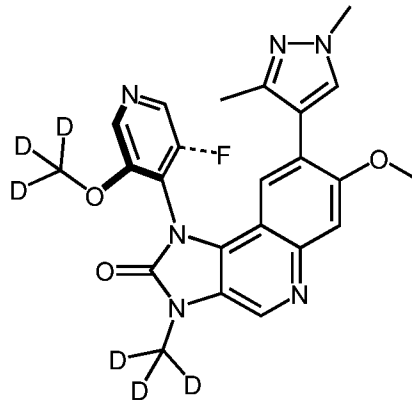


Compuesto 5,

En otras realizaciones, la presente invención proporciona los atropisómeros 3-a, 3-b, 4-a, 4-b, 5-a y 5-b:

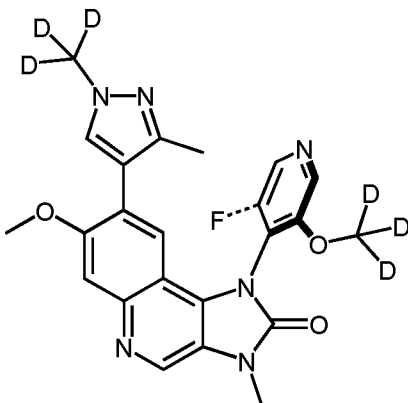


Compuesto 3-a

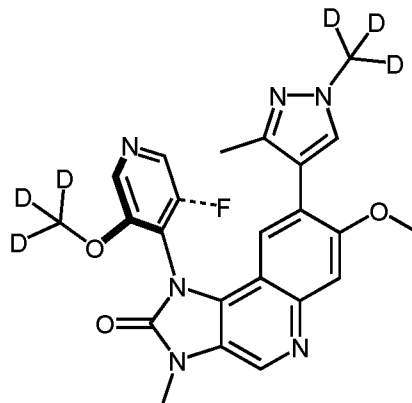


Compuesto 3-b

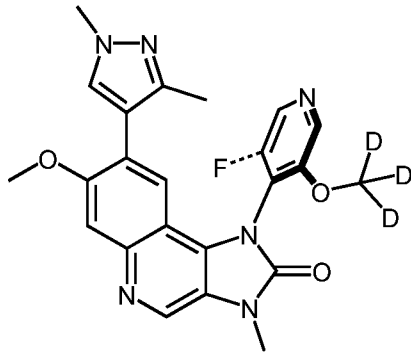
5



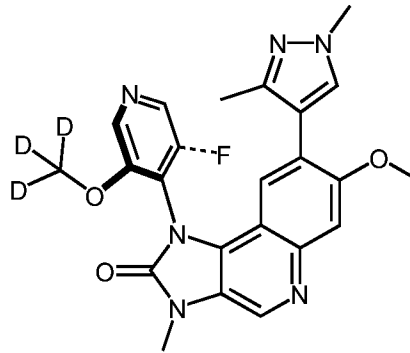
Compuesto 4-a



Compuesto 4-b



Compuesto 5-a



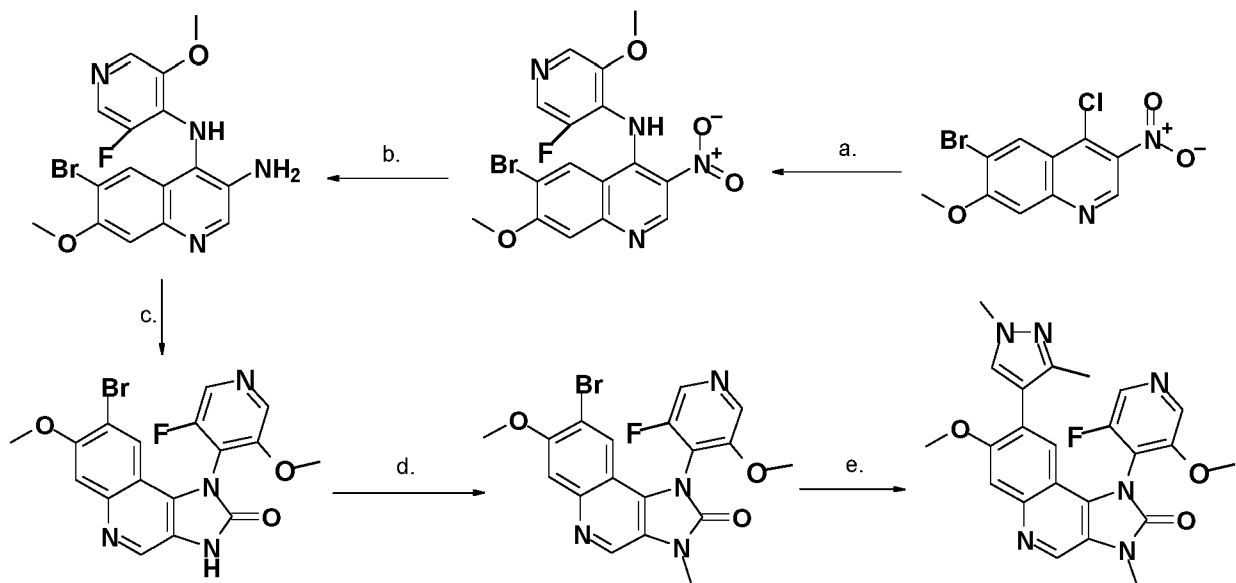
Compuesto 5-b

En armonía con lo expuesto anteriormente con respecto a los Compuestos 1 y 2, la presente invención proporciona el Compuesto 4-a, 5-a, 6-a, 4-b, 5-b, 6-b sustancialmente libre de los respectivos otro atropisómero, incluida cualquier sal del mismo. En realizaciones adicionales, estos compuestos también se proporcionan sustancialmente libres de impurezas. De acuerdo con otra realización, estos compuestos no contienen más de aproximadamente 5,0 por ciento de área de HPLC de impurezas orgánicas totales con respecto al área total del cromatograma de HPLC. Los intervalos ejemplares y preferidos descritos anteriormente para el Compuesto 1 en relación con "sustancialmente libre de Compuesto 2 o sal del mismo", "libre de impurezas" y el porcentaje de área de impurezas orgánicas totales son, por analogía, igualmente aplicables aquí en relación con los otros atropisómeros correspondientes del compuesto respectivo.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un atropisómero de los Compuestos 3, 4 o 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar esas composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona el uso de una composición descrita en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer. Las realizaciones ejemplares y preferidas como se describe anteriormente para el Compuesto 1 son igualmente aplicables a estos compuestos.

#### Preparación

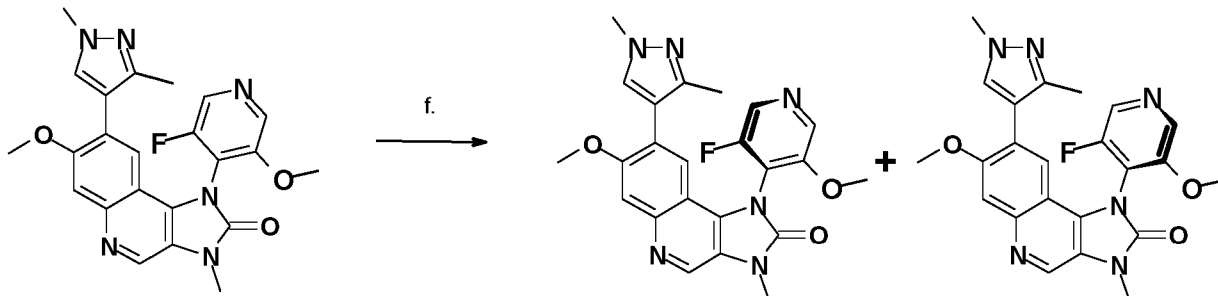
Los Compuestos 1 y 2 de acuerdo con la presente invención se pueden preparar a partir del Compuesto Y, compuesto que se ha descrito previamente. Como se describe en el documento WO 2016/155884, 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluoro-5-metoxipiridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5c]quinolin-2-ona (Compuesto Y) se puede preparar de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:



En el Ejemplo 1 se dan condiciones de reacción ejemplares para cada una de esas pasos a - e, al igual que los métodos para obtener los compuestos de partida. Otras condiciones de reacción adecuadas resultarán evidentes

para el experto en la materia.

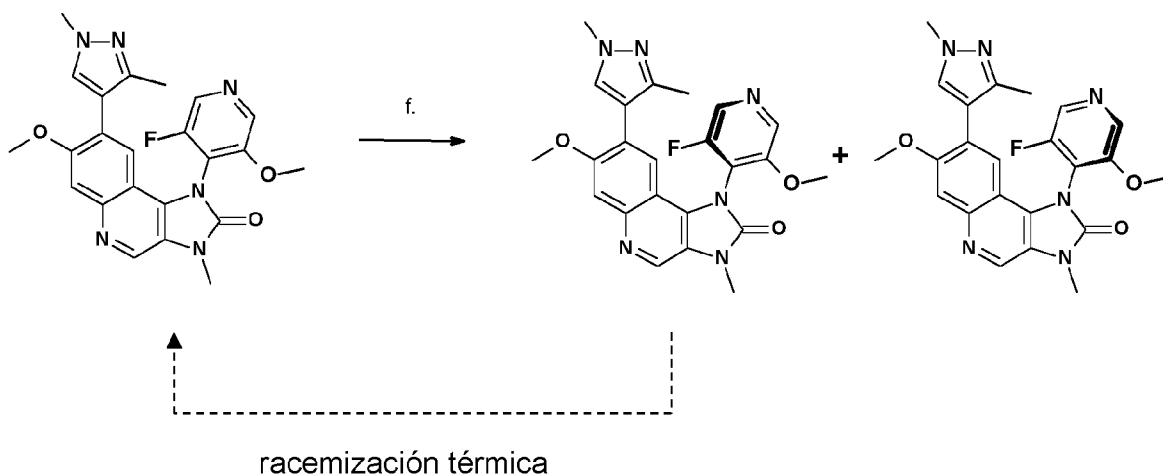
Los Compuestos 1 y 2 pueden obtenerse luego mediante métodos adecuados de separación del Compuesto Y, cuyos ejemplos de realización se proporcionan en los EJEMPLOS 1, 2 y 3.



- 5 Los atropisómeros se pueden separar a partir del Compuesto Y usando cromatografía quiral, incluida la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Los ejemplos de métodos adecuados se describen en detalle en los EJEMPLOS 1 y 3.

Los respectivos atropisómeros no deseados pueden someterse a racemización, por ejemplo, racemización térmica, para producir el Compuesto Y para su uso como nuevo material de partida, tal como se ilustra esquemáticamente a continuación a modo de ejemplo.

10

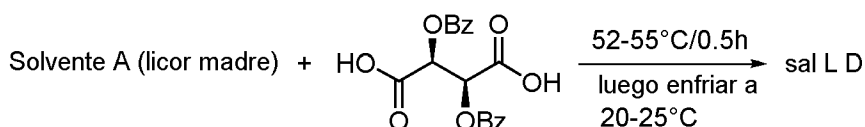
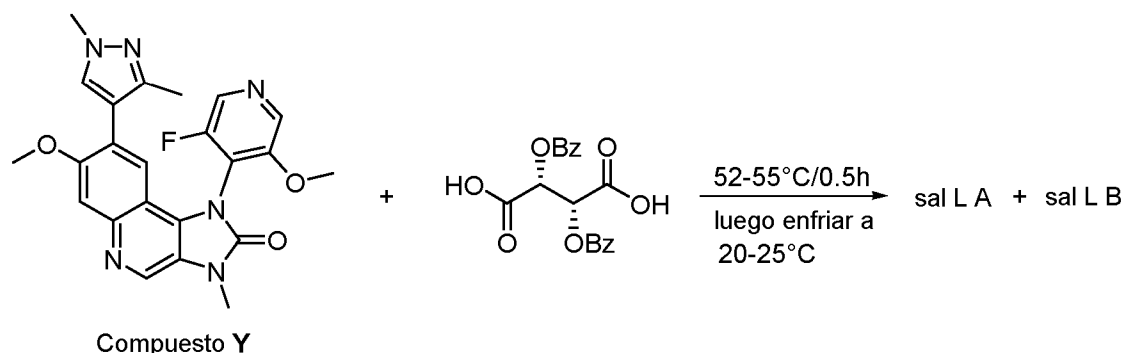


En una realización alternativa, los Compuestos 1 y 2 se pueden preparar a partir del Compuesto Y mediante cristalización usando un ácido ópticamente activo, por ejemplo, ácido dibenzoiltartárico. La reacción del Compuesto Y con el ácido ópticamente activo da un par de sales de atropisómeros. Estas sales de los Compuestos 1 y 2 exhiben diferentes propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, solubilidad, distribución de fases) y se pueden separar aprovechando estas diferencias.

15

Como se ilustra en el esquema de reacción siguiente, en una realización, el Compuesto Y se hace reaccionar con un ácido ópticamente activo, produciendo una mezcla de las dos sales en la solución madre, precipitando primero la sal del Compuesto 2 (sal L B) y eliminándola por filtración, en donde la sal correspondiente del Compuesto 1 (sal L A) se recolecta sólo después de una concentración adicional de la solución madre y precipitación. La sal del Compuesto 1 se convierte primero en su forma libre y se aísla y luego se hace reaccionar con la otra forma ópticamente activa correspondiente del ácido para dar la sal correspondiente del Compuesto 1, que, en un paso posterior, se convierte en la base libre con alta pureza óptica. Mientras tanto, el Compuesto 2 puede someterse a racemización para dar el compuesto Y como material de partida nuevo.

20



En el Ejemplo 2 y la figura 6 se proporciona un ejemplo detallado de un esquema de preparación adecuado.

Los Compuestos 3, 4 y 5 deuterados se pueden preparar como se describe en detalle en el Ejemplo 6 y los atropisómeros, sales, solvatos y formas sólidas se preparan sustancialmente como los de los Compuestos 1 y 2.

## 5 Uso

En lo que sigue, cualquier referencia general a los "compuestos de acuerdo con la presente invención" se aplicará a todas las realizaciones de los compuestos de la presente invención, incluidos los Compuestos 1 o 2, o una sal, solvato o forma sólida farmacéuticamente aceptable de los mismos, y puede leerse como "Compuesto 1 o 2, o sal, solvato o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo". De manera similar, cualquier referencia a compuestos deuterados de acuerdo con la presente invención incluirá cualquier atropisómero de los Compuestos 3, 4 o 5, o sal o forma sólida de los mismos.

La invención también abarca el uso de los presentes atropisómeros, formas sólidas farmacéuticamente aceptables, solvatos y sales de los mismos, así como inhibidores de ATM deuterados, atropisómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para la inhibición, regulación y/o modulación de la cascada de señalización de ATM cinasa y, por lo tanto, ofrece herramientas novedosas para la investigación y/o el diagnóstico. Por lo tanto, la invención se refiere además al uso de compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo formas deuteradas de los mismos para la inhibición de ATM cinasa. El término "inhibición" se refiere a cualquier reducción de la actividad que se base en la acción de los compuestos específicos de acuerdo con la invención, ya que estos últimos son capaces de interactuar con la molécula objetivo de tal manera que se lleva a cabo el reconocimiento, la unión y el bloqueo posibles. Los compuestos se distinguen por su alta afinidad por ATM cinasa. Además, los compuestos son altamente selectivos y, por tanto, permiten el reconocimiento directo y sustancialmente exclusivo de ATM cinasa. Para su uso en investigación y/o diagnóstico, los compuestos deuterados, es decir, los Compuestos 3, 4 o 5, o los atropisómeros o la sal o forma sólida de los mismos, se consideran útiles, por ejemplo, para su uso en ensayos.

La invención abarca generalmente el uso de los compuestos de acuerdo con la invención, incluidos los compuestos deuterados, en el tratamiento de enfermedades causadas, mediadas y/o propagadas por la actividad de la ATM cinasa.

Por lo tanto, la presente invención se refiere ampliamente a los compuestos de acuerdo con la invención, incluidos los compuestos deuterados, para su uso como medicamento.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a los compuestos de acuerdo con la invención, incluidos los compuestos deuterados, para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad que sea causada, mediada y/o propagada por la actividad de la ATM cinasa. En consecuencia, la presente invención también se refiere al uso de compuestos, incluidos los compuestos deuterados, de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquier enfermedad causada, mediada y/o propagada por la actividad de ATM cinasa. En otras palabras, la presente invención también describe un compuesto de acuerdo con la invención, que incluye un compuesto deuterado, para su uso en el tratamiento de enfermedades que están influenciadas por la inhibición de ATM cinasa.

Además, los compuestos o compuestos deuterados de acuerdo con la invención también pueden usarse como reactivos para probar vías de señalización dependientes de cinasas en animales y/o modelos de cultivo celular o en las enfermedades clínicas mencionadas en esta solicitud. Como se analiza en el presente documento, estas vías de señalización son relevantes para diversas enfermedades.

5 La presente invención también se refiere a los compuestos de acuerdo con la presente invención, incluyendo sales, solvatos, formas sólidas y deuteradas farmacéuticamente aceptables de los mismos, para uso en el tratamiento de cáncer y/o tumores; y su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer y/o tumores.

10 En este tratamiento del cáncer y/o tumores, una cantidad eficaz de al menos un compuesto, o una sal, solvato, deuterado o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la invención se administra a un sujeto que va a ser tratado. Los sujetos preferidos en el sentido de la invención son humanos o animales, particularmente preferiblemente humanos.

15 El cáncer/tumor puede seleccionarse, en particular, del grupo de cáncer/tumor del epitelio escamoso, vejiga, estómago, riñones, cabeza, cuello, esófago, cuello uterino, tiroides, intestino, hígado, cerebro, próstata, tracto urogenital, sistema linfático, laringe, pulmón, piel, sangre y sistema inmunológico, y/o el cáncer puede seleccionarse del grupo de leucemia monocítica, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de ovario, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfática aguda, leucemia linfática crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin. Debe entenderse que la sensibilización de las células cancerosas abarcará células de los mismos cánceres y tumores mencionados anteriormente.

20 La presente invención también se refiere a un medicamento que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y/o una sal, solvato, deuterado o sólido farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención y/o una sal, solvato, deuterado o sólido farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Un "medicamento" y una "composición farmacéutica" deben entenderse como cualquier composición que pueda emplearse en el tratamiento de pacientes que, al menos temporalmente, presentan una modificación patógena del estado general o del estado de partes individuales del organismo del paciente, preferiblemente como consecuencia de cáncer y/o tumores.

30 El suministro de los compuestos respectivamente de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en una célula u organismo se puede llevar a cabo de acuerdo con la invención de cualquier manera que permita que la ATM cinasa se ponga en contacto con los compuestos presentes en la composición farmacéutica, tal como una consecuencia de la cual se induce una respuesta. La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral, transdérmica, transmucosa, transuretral, vaginal, rectal, pulmonar, enteral y/o parenteral. El tipo de administración seleccionada depende de la indicación, la dosis a administrar, los parámetros específicos del individuo, etc. En particular, varios tipos de administración pueden facilitar la terapia específica del sitio, lo que minimiza los efectos secundarios y reduce la dosis del compuesto activo. Las inyecciones pueden ser intradérmicas, subcutáneas, intramusculares o intravenosas. La administración puede realizarse, por ejemplo, con la ayuda de las denominadas pistolas de vacunación o mediante jeringas. También es posible proporcionar la sustancia en forma de aerosol, que sea inhalado por el organismo, preferiblemente un paciente humano.

40 En realizaciones preferidas, los compuestos de acuerdo con la presente invención (en cualquiera de sus formas) se administran por vía oral. La administración oral es favorable en términos de cumplimiento por parte del paciente. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas son preferiblemente composiciones farmacéuticas sólidas orales.

45 Es una ventaja de los compuestos de acuerdo con la presente invención, en particular los Compuestos 1 y 2 y sus formas sólidas, en particular el Compuesto 1 respectivamente una forma sólida del mismo, que se prestan fácilmente a la formulación en una forma de dosificación sólida oral, debido a buena estabilidad y alta biodisponibilidad.

#### Composiciones

50 Las composiciones, respectivamente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar usando excipientes sólidos o líquidos convencionales correspondientes al tipo de administración deseado en una dosis adecuada y de una manera conocida *per se*. Así, los excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos por el experto en la técnica pueden formar básicamente parte de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en donde varía la cantidad de excipiente (s) que se combina con el

compuesto activo para preparar una dosis única dependiendo de la dosis y el tipo de administración. Esos excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen cargas, estabilizadores, agentes complejantes, antioxidantes, solventes, aglutinantes, lubricantes, sales, amortiguadores, conservadores, ajustadores y similares. Ejemplos de excipientes de este tipo son agua, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, alquilenglicol, polietilenglicol, Kolliphor, triacetato de glicerol, gelatina, carbohidratos tales como, por ejemplo, lactosa o almidón, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), estearato de magnesio, talco y Vaselina.

Como se mencionó anteriormente, la presente composición farmacéutica es preferiblemente para administración oral. La composición farmacéutica generalmente puede estar en forma de tableta, tableta de película, gragea, pastilla, cápsula, píldora, polvo, gránulos, jarabe, jugo, gotas, solución, dispersión, suspensión, supositorio, emulsión, implante, crema, gel, ungüento, pasta, loción, suero, aceite, spray, aerosol, adhesivo, yeso o vendaje. Las formas de administración oral son preferiblemente tabletas, tabletas de película, grageas, grageas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, jarabes, jugos, gotas, soluciones, dispersiones o suspensiones.

Además, se pueden considerar composiciones farmacéuticas parenterales, tales como, por ejemplo, supositorios, suspensiones, emulsiones, implantes o soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas. Para aplicación tópica, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, celulosa microcristalina, y opcionalmente otros auxiliares, tales como, por ejemplo, humectantes, para dar composiciones que se puedan aplicar sobre la piel, tales como, por ejemplo, cremas, geles, pomadas, pastas, polvos o emulsiones, o para dar formulaciones líquidas que se puedan aplicar sobre la piel, tales como, por ejemplo, soluciones, suspensiones, lociones, sueros, aceites, aerosoles o aerosoles.

La composición farmacéutica también podría estar en forma de solución inyectable. Para la preparación de la solución de inyección se puede usar un medio acuoso, tal como por ejemplo agua destilada o soluciones salinas fisiológicas. La composición farmacéutica también se puede proporcionar en forma de una composición sólida, por ejemplo en estado liofilizado, y luego se puede preparar para la administración mediante inyección mediante la adición de un agente de disolución, tal como, por ejemplo, agua destilada o un amortiguador. El experto en la materia está familiarizado con los principios básicos de la preparación de liofilizados.

La cantidad de un compuesto de acuerdo con la presente invención en la composición farmacéutica que contiene al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser del 0,1 al 100 por ciento en peso. Es crucial que la composición farmacéutica comprenda una cantidad eficaz del compuesto, opcionalmente junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica simple puede ser el compuesto de acuerdo con la presente invención en forma sólida, tal como un polvo, en una cápsula de gelatina dura. Los términos "cantidad eficaz" o "dosis eficaz" se usan indistintamente en el presente documento e indican una cantidad del compuesto de acuerdo con la presente invención que tiene un efecto terapéuticamente relevante sobre una enfermedad o cambio patológico en una célula, tejido, órgano o mamífero, preferiblemente cáncer y/o tumor.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de acuerdo con la invención se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, que, cuando se administra a un paciente con una afección dependiente o modulada por ATMi, preferiblemente cáncer, tendrá el efecto terapéutico pretendido, por ejemplo, alivio, mejora, paliación o eliminación de una o más manifestaciones de la afección, respectivamente, cáncer en el paciente, o cualquier otro resultado clínico en el curso del tratamiento de un paciente. Un efecto terapéuticamente eficaz no ocurre necesariamente mediante la administración de una dosis y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones. Tal cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del compuesto de acuerdo con la invención, solo o en combinación, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan cualquier efecto tóxico o perjudicial de un compuesto de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, un compuesto de acuerdo con la invención (o sal, solvato, deuterado o sólido) se administra a una dosis de 5 mg a 1 g por unidad de dosificación, por ejemplo entre 10 y 750 mg por unidad de dosificación, tal como entre 20 y 500 mg por unidad de dosificación, tal como 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 o 350 mg por unidad. Se ha estimado que una dosis biológicamente eficaz para el Compuesto 1 está en el intervalo de 25 a 350 mg una vez al día.

Debido a su inhibición sorprendentemente fuerte y/o selectiva de la ATM cinasa, que regula los procesos celulares mediante la reparación del ADN bicatenario, los compuestos de la invención pueden administrarse en una dosis ventajosamente baja, mientras logran eficacia biológica similar o incluso superior en comparación con inhibidores menos potentes o menos selectivos. Una dosis reducida se asocia típicamente con efectos secundarios médicos reducidos. Además, la inhibición altamente selectiva generalmente también se refleja en una reducción de los efectos secundarios no deseados.

"Tratar" o "tratamiento de" una afección o un paciente se refiere a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio, mejora de uno o más síntomas de la enfermedad a tratar, más preferiblemente cáncer; disminución de la extensión de la enfermedad; retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad; mejora, paliación o estabilización del estado de enfermedad; u otros resultados beneficiosos. Debe apreciarse que las referencias a "tratar" o "tratamiento" incluyen tanto la profilaxis como el alivio de los síntomas establecidos de una afección. Por lo tanto, "tratar" o el "tratamiento" de un estado, trastorno o afección incluye: (1) prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos del estado, trastorno o afección que se desarrolla en un sujeto que pudiera estar afligido o predispuesto al estado, trastorno o afección, pero aún no experimente ni muestre síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección, (2) inhibir el estado, trastorno o afección, es decir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma (en caso de tratamiento de mantenimiento) o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos, o (3) aliviar o atenuar la enfermedad, es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o afección o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos. En determinadas realizaciones, "tratar" incluye (1) y (2).

"Tumor", tal como se aplica a un sujeto diagnosticado o que se sospecha que tiene un cáncer, se refiere a una neoplasia maligna o potencialmente maligna o masa tisular de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasmas secundarios. Un tumor sólido es un crecimiento anormal o una masa de tejido que generalmente no contiene quistes ni áreas líquidas. Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben el nombre del tipo de células que los forman. Ejemplos de tumores sólidos son sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) generalmente no forman tumores sólidos.

"Administrar" o "administración de" un compuesto a un paciente (y equivalentes gramaticales de esta frase) se refiere a la administración directa, que puede ser la administración a un paciente por un profesional médico, o puede ser autoadministración y/o administración indirecta, que puede ser el acto de recetar un medicamento. Por ejemplo, se considerará que un médico que instruye a un paciente a autoadministrarse un fármaco o le proporciona una receta para un fármaco administra el fármaco al paciente en el contexto de la presente invención.

Todos los excipientes u otros componentes anteriores y adicionales de un medicamento o formulación farmacéutica son familiares para el experto en la técnica y pueden experimentar una formulación especial para la enseñanza de acuerdo con la invención en experimentos de rutina.

#### Terapia de combinación

Los medicamentos y composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de acuerdo con la invención y el uso de estos compuestos para el tratamiento de trastornos mediados por cinasas son un enfoque muy prometedor para el tratamiento del cáncer, en particular. Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar como monoterapia, pero preferiblemente, tal como se describió anteriormente, en combinación con otras terapias, tales como, por ejemplo, quimio o radioterapia. Como se expuso anteriormente, la referencia a un compuesto incluirá cualquier sal, solvato, forma deuterada o sólida del mismo.

La participación clave de ATM en los procesos de reparación del ADN y la evidencia de que la deficiencia de ATM cinasa permite que las células de mamíferos se vuelvan más sensibles a la radiación permite el uso terapéutico de los inhibidores específicos de ATM como parte del tratamiento del cáncer, por ejemplo, tumores sólidos, mediante radioterapia y/o quimioterapia, estando la quimioterapia dirigida preferiblemente a inducir daño de doble hebra del ADN. Como se explicó anteriormente, la ATM es una intervención atractiva para inhibir la reparación de los DSB inducidos por la terapia. Por lo tanto, los compuestos de acuerdo con la presente invención, en cualquiera de sus formas, son muy ventajosos en combinación con radioterapia y/o quimioterapia que daña el ADN.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una combinación de un compuesto de acuerdo con la invención y radioterapia (RT). Por consiguiente, la presente invención se refiere a un compuesto de la presente invención, o una sal o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer y/o tumores en combinación con radioterapia. Expresado de manera diferente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención, o una sal o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer y/o tumores en combinación con radioterapia y, por lo tanto, un método de tratamiento de cáncer que implica la administración de un compuesto de acuerdo con la presente invención o una sal o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con radioterapia. La presente invención se refiere además a un compuesto de acuerdo con la presente invención o una sal o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la sensibilización de las células cancerosas a la radiación ionizante y respectivamente a la radioterapia (RT).

Se ha demostrado que el Compuesto 1 conduce a importantes respuestas antitumorales dependientes de la dosis *in vivo* en combinación con programas de radiación clínicamente relevantes (es decir, radioterapia). El Ejemplo 8 y la figura 20 proporcionan detalles de los resultados obtenidos.

Un régimen de administración adecuado puede implicar, por nombrar solo un ejemplo, la administración de una dosis de RT de 15 Gray (Gy) administrada en 5 fracciones (3 Gy administradas por fracción de día) durante una semana (es decir, en 5 días consecutivos, seguido de 2 días sin) y en los mismos días la administración de un compuesto de acuerdo con la invención por vía oral, que puede repetirse al menos una vez.

- 5 Los métodos de irradiación industrial que se usan clínicamente preferiblemente incluyen irradiación de fotones (clásica, radiación electromagnética de rayos X/gamma), irradiación de protones, irradiación de iones pesados (carbono ionizado) e irradiación de neutrones, sin estar restringido a los mismos. Estas radioterapias y otras terapias de irradiación adecuadas en el sentido de la invención son conocidas por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, de Herrmann et al. (2006) *Klinische Strahlenbiologie [Biología de radiación clínica]*, Elsevier Munich, 4ª edición, 67-68; Bhide y Nutting (2010) *BMC Medicine* 8: 25; Choi & Hung (2010) *Current Urology Reports* 11 (3): 172). Como aplicación más frecuente, la irradiación de fotones se ha perfeccionado técnicamente mediante el método IMRT (radioterapia de intensidad modulada) y mediante métodos de formación de imágenes (radioterapia conformada tridimensional) en la planificación y el rendimiento de la irradiación para un enfoque lo más preciso posible.
- 10
- 15 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una combinación de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un agente que daña el ADN; por lo tanto, para un compuesto de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer y/o un tumor en combinación con un agente que daña el ADN, el uso de un compuesto de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en combinación con un agente que daña el ADN. Tratamiento del cáncer que implica la administración de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un agente que daña el ADN. Como se explicó en general en el presente documento anteriormente, el compuesto incluirá sales, formas sólidas y solvatos farmacéuticamente aceptables, en particular en relación con las composiciones y los tratamientos.
- 20

La administración del compuesto y agente que daña el ADN de acuerdo con la presente invención puede ser simultánea o secuencial.

- 25 Como se usa en este documento, un agente que daña el ADN es un agente que es capaz de inducir daño al ADN en una célula, particularmente preferiblemente en una célula cancerosa, con realizaciones ejemplares que se mencionan a continuación.

30 Como se explicó anteriormente, la ATM cinasa es un regulador clave de la reparación de la ruptura de la doble cadena del ADN (DSB), que es inducida por terapias contra el cáncer ampliamente usadas, tal como la radiación ionizante (IR) y los agentes que dañan el ADN. Luego de los eventos DSB, ATM envía señales a una multitud de efectores descendentes, incluido p53. Los DSBs no reparados provocan la activación de las respuestas de los puntos de control, la detención del ciclo celular y, en última instancia, la muerte de las células tumorales.

En una realización de la invención, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto terapéuticamente eficaz de acuerdo con la invención y un agente que daña el ADN.

- 35 Un agente que daña el ADN adecuado para su uso en la combinación (terapia), incluida la composición farmacéutica o el kit, se selecciona preferiblemente del grupo que comprende:

- agentes alquilantes, tal como altretamina, bendamustina, busulfán, carmustina, cloroambucilo, clorometina, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, tosilato de improsulfán, lomustina, melfalán, mitobronitol, mitolactol, nimustina, ranimustina, temozolomida, tiotepa, treosulfán, mecloroetamina, carbocuoona, apaziquona, fotemustina, glufosfamida, palifosfamida, pipobroman, trofosfamida, uramustina;
  - compuestos de platino, tales como carboplatino, cisplatino, eptaplatino, hidrato de miriplatino, oxaliplatino, lobaplatino, nedaplatino, picoplatino, satraplatino;
  - Inhibidores de la topoisomerasa, por ejemplo, irinotecano, SN38, topotecano, camptotecina, rubitecano, belotecano, etopósido, daunorrubicina, doxorubicina, aclarubicina, epirubicina, idarubicina, amrubicina, pirarubicina, valrubicina, zorubicina, amsacrina;
  - inhibidores de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP), por ejemplo, olaparib, niraparib, veliparib;
  - Inhibidores de ATR (ataxia telangiectasia y relacionados con Rad3), por ejemplo M6620 (VX-970: 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonil)-fenil]-pirazin-2-ilamina), M4344 (VX-803: [5'-fluoro-4-(4-oxetan-3-il-piperazin-1-carbonil)-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,4]bipiridinil-3'-il]-amida de ácido 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico); AZD-6738 (4-[4-[1-[[S(R)]-S-metilsulfonimidol]ciclopropil]-6-[(3R)-3-metil-4-morfolinil]-2-pirimidinil]-1H-pirrol-2,3-b]piridina) y 2-[[3(R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina);
- 40
- 45
- 50

• Agentes modificadores del ADN, tal como amrubicina, bisantreno, decitabina, mitoxantrona, procarbazona, trabectedina, clofarabina, amsacrina, brostalicina, pixantrona, laromustina;

5 • antibióticos anticáncer, tal como bleomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, levamisol, miltefosina, mitomicina C, romidepsina, estreptozocina, valubicina, zinostatina, zorrubicina, daunubicina, plicamicina, aclarubicina, peplomycin, pirarubicina;

• emisores alfa, tales como alfaradina (dicloruro de  $^{223}\text{Ra}$ , Xofigo),  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ;

Se da preferencia particular a etopósido, irinotecán, razoxano, sobuzoxano, topotecán, camptotecina, doxorubicina, amsacrina, inhibidores de PARP e inhibidores de ATR.

10 La eficacia del Compuesto 1 en combinación con el inhibidor de PARP ejemplar olaparib se demostró en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo derivado del paciente HBCx-10, desarrollado en ratones hembra inmunodeficientes, cuyos resultados se muestran en la figura 21. Más detalles de este experimento se describen en el Ejemplo 9.

15 La invención también se puede practicar como un kit, que contenga un compuesto de acuerdo con la invención. El kit consta de paquetes separados (a) de una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención y/o una sal fisiológica, solvato o forma sólida del mismo y (b) de una cantidad eficaz de un compuesto activo adicional. El compuesto activo adicional es preferiblemente un agente que daña el ADN.

20 El kit puede contener recipientes adecuados tales como, por ejemplo, cajas o cartones, botellas individuales, bolsas o ampollas. El kit puede contener, por ejemplo, ampollas o viales separados, cada uno de los cuales contenga una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención y/o una sal, solvato o forma sólida farmacéuticamente aceptable del mismo, o una cantidad eficaz de un compuesto activo adicional, tal como un agente que daña el ADN en forma disuelta o liofilizada. El kit de la invención también puede contener un artículo que contenga instrucciones escritas o indica al usuario instrucciones escritas, que explican el manejo de los compuestos de la invención.

25 En resumen, cabe señalar que los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse individualmente y/o en combinación con otras medidas de tratamiento, tales como, por ejemplo, intervenciones quirúrgicas, inmunoterapia, radioterapia y/o quimioterapia. Estos últimos se relacionan con la terapia dirigida con cualquier compuesto activo deseado (químico o biológico, incluidos nMEs: nuevas entidades moleculares, NCEs: nuevas entidades químicas y NBEs: nuevas entidades biológicas) tales como monoterapia y/o terapia de combinación dentro/fuera del objetivo.

30 No hace falta decir que esta invención no está restringida a los compuestos, composiciones farmacéuticas, usos y métodos específicos como se describen en el presente documento, ya que tales cosas pueden variar. Además, no hace falta decir que la terminología usada aquí sirve exclusivamente para el propósito de descripción de realizaciones particulares y no pretende restringir el alcance de protección de la invención. Como se usa aquí en la descripción, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas de palabras en singular, tal como, por ejemplo, "un" o "el", incluyen el equivalente en plural, siempre que el contexto no indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye un solo compuesto o una pluralidad de compuestos, que a su vez pueden ser idénticos o diferentes, o la referencia a "un método" incluye pasos y métodos equivalentes que son conocido por el experto en la materia. Hacer referencia a la materia como "que comprende" ciertas características se interpretará en el sentido de que el tema debe incluir esas características, pero que no excluye la presencia de otras características, siempre que estas no hagan inviable la materia.

### *Parte experimental*

Los compuestos de acuerdo con la invención presentan propiedades ventajosas, tal como lo demuestran diversos parámetros y resultados experimentales. Los métodos experimentales usados para el análisis y caracterización de los compuestos de acuerdo con la invención, en todas sus formas, se proporcionan a continuación.

#### 45 Ensayos

50 La medición de la actividad cinasa es una técnica bien conocida por el experto en la materia. Los sistemas de prueba genéricos para la determinación de la actividad cinasa usando sustratos, por ejemplo histona (Alessi et al. (1996) FEBS Lett. 399 (3): 333) o la proteína de mielina básica, se describen en la literatura (Campos- González y Glenney (1992) JBC 267: 14535). Se encuentran disponibles varios sistemas de ensayo para la identificación de inhibidores de cinasas. En el ensayo de centelleo de proximidad (Sorg et al. (2002) J Biomolecular Screening 7: 11) y el ensayo de placa de vaporización, se mide la fosforilación radiactiva de una proteína o péptido como sustrato usando ATP. En presencia de un compuesto inhibidor, se detecta una señal radiactiva disminuida o ninguna.

Además, las tecnologías homogéneas de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTR-FRET) y polarización de fluorescencia (FP) son útiles como métodos de ensayo (Sills et al. (2002) J Biomolecular Screening 191). Otros métodos ELISA no radiactivos usan fosfoanticuerpos específicos (fosfo-AB). El fosfo-AB se une solo al sustrato fosforilado. Esta unión puede detectarse por quimioluminiscencia usando un segundo anticuerpo anti-oveja conjugado con peroxidasa.

Para los propósitos de la presente invención, se evaluaron las propiedades relevantes en el objetivo de los compuestos usando los siguientes ensayos:

*Ensayo de cinasa ATM - determinación de la inhibición de ATM (IC50 ATM):*

El valor de IC50 se determinó con la ayuda de un ensayo de cinasa ATM bioquímico. El ensayo consta de dos pasos: la reacción enzimática y el paso de detección. En primer lugar, la proteína ATM (ataxia telangiectasia mutada) y la sustancia de ensayo se incuban a diferentes concentraciones con la adición de la proteína sustrato p53 y ATP. ATM media la fosforilación de p53 en varias posiciones, incluido el aminoácido S15. La cantidad de p53 fosforilada se determina con la ayuda de anticuerpos específicos y la técnica TR-FRET. El ensayo enzimático ATM se lleva a cabo como ensayo de 384 pocillos con base en TR-FRET (HTRFTM, Cisbio Bioassays). En el primer paso, se incubó ATM recombinante humano purificado (ATM humano, longitud completa, GenBank ID nM\_000051, expresado en una línea celular de mamífero) en amortiguador de ensayo durante 15 minutos con el inhibidor de ATM en varias concentraciones y sin la sustancia de prueba como negativa o neutra control. El amortiguador de ensayo comprende HEPES 25 mM pH 8,0, mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, BSA al 0,1% y Brij® 35 al 0,01%, ditiotreitól (DTT) 5 mM. Las soluciones de la sustancia de ensayo se dispensaron en las placas de microtitulación usando un ECHO 555 (Labcyte). En el segundo paso, se añaden p53 recombinante humano purificado marcado con c-myc (p53 humano, longitud completa, GenBank ID BC003596, expresado en células de insecto Sf21) y ATP, y la mezcla de reacción se incubó a 22°C durante 30-35 minutos. El volumen de ensayo farmacológicamente relevante es de 5 µl. Las concentraciones finales en el ensayo durante la incubación de la mezcla de reacción son 0,3 0,4 nM ATM, 50 - 75 nM p53 y 10 µM ATP. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de EDTA. La formación de p53 fosforilado como resultado de la reacción mediada por ATM en presencia de ATP se detecta mediante anticuerpos específicos [marcados con el fluoróforo europeo (Eu) como donante y d2 como aceptor (Cisbio Bioassays)] que permiten FRET. 2 µl de solución de parada que contiene anticuerpos (HEPES 12,5 mM pH 8,0, EDTA 125 mM, cloruro de sodio 30 mM, fluoruro de potasio 300 mM, Tween-20 al 0,1006%, Brij® 35 al 0,005%, anticuerpo anti-fosfo-p53 (ser15)-Eu 0,21 nM y anticuerpo anti-cmyc-d2 15 nM) se añaden a la mezcla de reacción. Después de la incubación, generalmente durante 2 horas (entre 1,5 y 15 horas), para el desarrollo de la señal, las placas se analizan en un lector de placas (EnVision, PerkinElmer) usando el modo TRF (y con excitación láser). Después de la excitación del europio donante a una longitud de onda de 340 nM, se mide la luz de fluorescencia emitida tanto del aceptor d2 a 665 nM como también del Eu donante a 615 nM. La cantidad de p53 fosforilada es directamente proporcional al cociente de las cantidades de luz emitida, es decir, las unidades de fluorescencia relativa (RFU) a 665 nM y 615 nM. Los datos de medición se procesaron mediante el software Genedata Screener. Las determinaciones de IC50 se llevan a cabo, en particular, ajustando una curva de dosis/acción a los puntos de datos mediante análisis de regresión no lineal.

IC50 = concentración inhibitoria media máxima

ATP = trifosfato de adenosina

TR-FRET = transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo

HTRF® = fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo

HEPES = ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfónico

Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> = acetato de magnesio

MnCl<sub>2</sub> = cloruro de manganeso(II)

BSA = albúmina de suero bovino

EDTA = tetraacetato de etilendiamina

TRF = fluorescencia resuelta en el tiempo

Las abreviaturas se aplican en todas partes, a menos que se indique lo contrario.

El ensayo para determinar el valor de IC50 a una concentración de ATP de 1000  $\mu\text{M}$  difiere del ensayo anterior solo en esa concentración de ATP.

*Ensayo de pCHK2 celular:*

5 Para la identificación de sustancias que inhiben la fosforilación de la proteína cinasa CHK2 (punto de control cinasa 2) en el aminoácido treonina 68, se usó un ensayo de análisis de alto contenido con base en inmunofluorescencia en células HCT116.

Ensayo de inmunofluorescencia celular *in vitro* para la identificación de inhibidores de la fosforilación de CHK2 (fosfo-Thr68) inducida por bleomicina en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT116:

10 Se siembran células HCT116 en una densidad celular definida en placas de 384 pocillos en medio de cultivo (DMEM de glucosa alta, GlutaMax 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, FCS al 10%) y se incuban durante la noche a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las sustancias de ensayo se añaden en un intervalo de concentración definido (1 nM a 30  $\mu\text{M}$ ) en combinación con bleomicina 10  $\mu\text{M}$ , en donde la concentración del solvente DMSO se mantiene constante al 0,5%. Después de cuatro horas de incubación a 37°C y 10% de CO<sub>2</sub>, las células se fijan (5 min, formaldehído al 4% en PBS), se permeabilizan (10 min, Triton X 100 al 0,2% en PBS) y, después del bloqueo de los sitios de unión inespecífica (suero de cabra al 10%, BSA al 1% en PBS), incubados durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-pCHK2 específico (señalización celular # 2661). El pCHK2 (Thr68) se determina usando un anticuerpo anti-IgG de conejo secundario marcado con Alexa488. La tinción paralela del ADN con yoduro de propidio permite la determinación del recuento celular. La señal pCHK2 se detecta usando un generador de imágenes de alto contenido (Molecular Devices IMX Ultra) y análisis automático de imágenes usando el software MetaXpress que pertenece al instrumento. Se determina el número de núcleos celulares que tienen una señal pCHK2 por encima de un fondo definido.

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco; FCS: suero de ternero fetal, PBS: solución salina amortiguada con fosfato (las abreviaturas se aplican en todas partes, a menos que se indique lo contrario)

25 Además, el efecto, en particular la inhibición, de otras cinasas y, por tanto, la selectividad de los compuestos de acuerdo con la invención se puede determinar con ayuda de los siguientes ensayos:

*Ensayo de ATR cinasa/ATRIP*

30 El valor de IC50 se determinó mediante un ensayo enzimático ATR/ATRIP. El ensayo consta de dos pasos: la reacción enzimática y el paso de detección. Primero, una mezcla de proteína ATR/ATRIP (Ataxia Telangiectasia y proteína relacionada con Rad3/proteína que interactúa con ATR), el compuesto en cuestión a diferentes concentraciones, p53 como proteína sustrato y trifosfato de adenosina (ATP) se incuban en amortiguador de ensayo. ATR fosforila p53 en Ser15 y otros residuos. A continuación, se detecta la cantidad de p53 fosforilada usando anticuerpos específicos y la tecnología de ensayo TR-FRET.

35 En detalle: El ensayo enzimático ATR/ATRIP se lleva a cabo como un ensayo de 384 pocillos con base en TR-FRET-(HTRFTM, Cisbio Bioassays). En un primer paso, ATR/ATRIP recombinante humano purificado (ATR humano, longitud completa, GenBank ID: NM\_001184.3, y ATRIP humano, completo, GenBank ID AF451323.1, co-expresado en una línea celular de mamífero) se incuban en amortiguador de ensayo durante 15 minutos a 22°C con compuesto de ensayo a diferentes concentraciones o sin compuesto de ensayo (tal como control negativo). El amortiguador de ensayo contiene HEPES 25 mM pH 8,0, Mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, BSA al 0,1%, Brij® 35 al 0,01% y ditiotreitól (DTT) 5 mM. Se usa un Echo 555 (Labcyte) para dispensar soluciones compuestas. Luego, en un segundo paso, se añaden p53 recombinante humana etiquetada con cmyc purificada (p53 humana, longitud completa, GenBank ID: BC003596, expresada en células de insecto Sf21) y ATP y la mezcla de reacción se incuban durante 25 a 35 minutos, normalmente 25 minutos, a 22°C. El volumen de ensayo farmacológicamente relevante es de 5  $\mu\text{l}$ . Las concentraciones finales en el ensayo durante la incubación de la mezcla de reacción son 0,3 - 0,5 nM, típicamente 0,3 nM, ATR/ATRIP, p53 50 nM y ATP 0,5  $\mu\text{M}$ . La reacción enzimática se detiene mediante la adición de EDTA. La generación de p53 fosforilada como resultado de la reacción mediada por ATR en presencia de ATP se detecta mediante el uso de anticuerpos específicos [marcados con los fluoróforos europio (Eu) como donante y d2 como aceptor (Cisbio Bioassays)] que permiten FRET. Para este propósito, 2  $\mu\text{l}$  de solución de parada que contiene anticuerpos (HEPES 12,5 mM pH 8,0, EDTA 125 mM, cloruro de sodio 30 mM, fluoruro de potasio 300 mM, Tween-20 al 0,006%, Brij® 35 al 0,005%, anticuerpo anti-fosfo-p53(Ser15)-Eu 0,21 nM, anticuerpo anti-cmyc-d2 15 nM) se añaden a la mezcla de reacción. Después del desarrollo de la señal durante 2 h, las placas se analizan en un lector de microplacas EnVision (PerkinElmer) usando el modo TRF con excitación láser. Luego de la excitación del europio donante a 340 nm, se miden la luz de fluorescencia emitida del aceptor d2 a 665 nm así como del Eu donante a 615 nm.

La cantidad de p53 fosforilada es directamente proporcional a la relación de las cantidades de luz emitida, es decir,

la relación de las unidades de fluorescencia relativas (rfu) a 665 nm y 615 nm. Los datos se procesan empleando el software Genedata Screener. En particular, los valores de IC50 se determinan de la manera habitual ajustando una curva de respuesta a la dosis a los puntos de datos usando análisis de regresión no lineal.

Para las abreviaturas, consulte la lista anterior.

#### 5 *Ensayo celular pCHK1*

La cinasa Chk1 actúa aguas abajo de ATR y tiene un papel clave en el control del punto de control de daños en el ADN. La activación de Chk1 implica la fosforilación de Ser317 y Ser345 (considerado como el objetivo preferencial para la fosforilación/activación por ATR) y ocurre en respuesta a la replicación del ADN bloqueada y ciertas formas de estrés genotóxico. La fosforilación en Ser 345 sirve para localizar Chk1 en el núcleo después de la activación del punto de control.

Este ensayo mide una disminución en la fosforilación de Chk1 (Ser 345) en células de adenocarcinoma de colon HT29 después del tratamiento con compuesto e hidroxurea (que promueve el estancamiento de la horquilla debido al agotamiento de dNTP) y usando un procedimiento inmunocitoquímico e imágenes de alto contenido.

Para el ensayo, las células HT29 se siembran en medio de cultivo (DMEM de glucosa alta (sin rojo de fenol), glutamax 2 mM, piruvato 1 mM, FCS al 10% en placas Greiner de 384 pocillos, negras, µclear # 781090 (2500 células/pocillo/30 µl) y se incuban durante al menos 20 horas a 37°C, 10% de CO2 y 90% rH. Los compuestos de prueba diluidos (1 nM - 30 µM final) e hidroxurea (3 mM final) se agregan simultáneamente y las células se incuban durante 4 h a 37°C. Después de la fijación/permeabilización con MeOH al 100% (-20°C frío) y permeabilización con Triton X-100 al 0,2%. Se lleva a cabo un procedimiento inmunocitoquímico completo usando un anticuerpo anti-pChk1 específico (Cell Signalling, # 2348BF) y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (Alexa Fluor® 488 fragmento F(ab')2 de cabra anti-conejo, Invitrogen A11070) y tinción nuclear paralela para el recuento de células.

La señal pChk1 localizada en el núcleo se detecta en un lector de alto contenido confocal ImageXpress Ultra y se informa como% de células positivas (núcleos).

#### 25 *Ensayo de ADN-PK*

El ensayo de cinasa se llevó a cabo como ensayo de 384 pocillos con base en HTRF®. En un primer paso, el complejo de proteína ADN-PK se incubó con o sin el compuesto de prueba durante 15 min a 22°C. Después de la adición del sustrato STK-1-biotina (Cisbio), Mg-ATP, ADN y estaurosporina, la mezcla de reacción se incubó durante 60-80 min (dependiendo de la actividad del complejo de proteína ADN-PK) a 22°C. Se usó un Echo 555 (Labcyte) para dispensar soluciones compuestas. El amortiguador de ensayo consistía en HEPES 25 mM pH 7,4, MgCl2 11 mM, KCl 80 mM, EDTA 0,45 mM y EGTA 0,5 mM, y contenía ditiotretol (DTT) 1 mM, BSA al 0,17% y Tween® 20 al 0,01%. El volumen farmacológicamente relevante fue de 5 µl. Las concentraciones finales en el ensayo durante la incubación de la mezcla de reacción fueron 50-100 ng/pocillo de complejo de proteína ADN-PK (dependiendo de la actividad del complejo de proteína ADN-PK), 1 µM STK-sustrato 1-biotina, 10 µM Mg-ATP, 80 ng/bien ADN de timo de ternera y estaurosporina 1 µM. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de EDTA. La generación de sustrato STK fosforilado 1-biotina como resultado de la reacción mediada por ADN-PK se detectó mediante un anticuerpo anti-fosfo STK específico (Cisbio) marcado con europio (Eu) como donante y estreptavidina marcada con XL665 (Cisbio) como aceptor que permite FRET. Para este propósito, 4µl de solución de parada que contiene anticuerpos y estreptavidina (12,5 mM HEPES pH 8,0, 125 mM EDTA, 30 mM de cloruro de sodio, 300 mM de fluoruro de potasio, 0,006% de Tween-20, 0,005% de Brij® 35, 0,179 nM de anticuerpo anti-fosfo-STK, estreptavidina-XL665 160 nM) se añadieron a la mezcla de reacción. Después del desarrollo de la señal durante 1 hora, las placas se analizaron en un lector de microplacas Rubystar o Pherastar (BMG Labtech). La cantidad de sustrato fosforilado fue directamente proporcional a la relación de unidades de fluorescencia (longitud de onda de excitación 337 nm) a las longitudes de onda de emisión 665 nm (longitud de onda sensible a fosfopéptidos/emisión de XL665) a las unidades a 620 nm (longitud de onda de referencia europio). Los valores de IC50 se calcularon usando el software Genedata Screener®. (Molecular Cancer Therapeutics 2003, 1257-1264; inhibidores de la proteína cinasa dependientes del ADN como candidatos a fármacos para el tratamiento del cáncer; A. Kashishian, H. Douangpanya, D. Clark, S. T. Schlachter, C. Todd Eary, J. G. Schiro, H. Huang. L. E. Burgess, E. A. Kesicki y J. Halbrook.)

50 MgATP = magnesio 5'-O-[hidroxi(((hidroxifosfinato)oxi)fosfinato)oxi]fosforil]adenosina

Tween 20 = polisorbato 20

EGTA = ácido etilenglicol bis(aminoetil éter)N,N,N',N'-tetraacético

BSA = Albúmina de suero bovino

EDTA = tetraacetato de etilendiamina

*Ensayo celular pDNA-PK*

5 Las células HCT116 se cultivan en medio MEM alfa con suero de ternero fetal al 10% y glutamina 2 mM a 37°C y CO<sub>2</sub> al 10%. Las células se separaron del fondo de los recipientes de cultivo usando tripsina/EDTA, se centrifugaron en tubos de centrifuga, se recogieron en medio fresco y se determinó la densidad celular. Se sembraron 100.000 células en 1 ml de medio de cultivo por pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, se añadieron a las células 10 µM de bleomicina (intercalador de ADN e inductor de ruptura de doble cadena de ADN) y las sustancias de ensayo en medio de cultivo fresco y se cultivaron durante seis horas más. Luego se llevó a cabo la lisis celular y los lisados celulares se colocaron en una placa ELISA de 96 pocillos (Sigma-Aldrich WH0005591M2: ADN-PK total, Abcam ab18192 o Epitomics EM09912: fosfo-serina 2056 ADN-PK), que se bloqueó y se recubrió con Anticuerpo específico de ADN-PK, y se incubó a 4°C durante la noche. Posteriormente, las placas de ELISA de 96 pocillos se trataron con un anticuerpo de detección (Abcam ab79444: ADN-PK total) y un conjugado estreptavidina-HRP. El desarrollo de la reacción enzimática se llevó a cabo usando un reactivo quimioluminiscente, la quimioluminiscencia se midió usando el Mithras LB940. Las señales con el anticuerpo específico de fosfo-ADN-PK se normalizaron a la señal con el anticuerpo contra la proteína completa ADN-PKc. Los valores o porcentajes de IC<sub>50</sub> se determinaron haciendo referencia al nivel de señal del grupo de control del vehículo tratado con bleomicina (100% del control). El control de DMSO se usó como blanco.

20 MEM: Medio Esencial Mínimo; DMSO: sulfóxido de dimetilo

*Ensayo de PDE2A1*

Se usó un ensayo disponible comercialmente (Cerep, catálogo ref.4071, SOP n°1C1054), que está diseñado para evaluar los efectos de los compuestos sobre la actividad de la fosfodiesterasa-2A1 humana cuantificada midiendo la formación de 5'AMP a partir de cAMP usando una enzima recombinante humana expresada en células Sf9.

25 El compuesto de prueba, el compuesto de referencia o el agua (control) se añaden a un amortiguador que contiene Tris/HCl 40 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 8 mM y EGTA/NaOH 1,7 mM, cAMP 1,8 µM y 1 µCi [<sup>3</sup>H]cAMP.

Posteriormente, la reacción se inicia mediante la adición de la enzima (aproximadamente 2,5 U) y la mezcla se incuba durante 20 min a 22°C.

Para las medidas de control basal, la enzima se omite de la mezcla de reacción.

30 Después de la incubación se añaden perlas de SPA.

Después de 30 min a 22°C con agitación, se cuantifica la cantidad de [<sup>3</sup>H]5'AMP con un contador de centelleo (Topcount, Packard).

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control.

35 El compuesto de referencia inhibidor estándar es EHNA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina), que se prueba en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calcula su valor de IC<sub>50</sub>.

Referencia bibliográfica: Maurice D.H., Ke H., Ahmad F., Wang Y., Chung J. y Manganiello V. C. (2014), Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases, Nat. Rev. Drug Discov., Vol. 13 Ed. 4: p. 290.

*Ensayo de PDE4D2*

40 Se usó un ensayo de Cerep disponible comercialmente (catálogo ref.4077; SOP n°1C1045). El ensayo está diseñado para evaluar los efectos de los compuestos de prueba sobre la actividad de la fosfodiesterasa-4D2 humana cuantificada midiendo la formación de 5'AMP a partir de cAMP usando una enzima recombinante humana expresada en células Sf9.

45 El compuesto de prueba, el compuesto de referencia o el agua (control) se añaden a un amortiguador que contiene Tris/HCl 40 mM (pH 7,4) y MgCl<sub>2</sub> 8 mM, cAMP 450 nM y [<sup>3</sup>H]cAMP 0,0125 µCi.

Posteriormente, la reacción se inicia mediante la adición de la enzima (aproximadamente 1,5 U) y la mezcla se incuba durante 20 min a 22°C.

Para las medidas de control basal, la enzima se omite de la mezcla de reacción.

Después de la incubación, se añaden perlas de SPA (ensayo de centelleo por proximidad).

- 5 Después de 30 min a 22°C con agitación, se cuantifica la cantidad de [<sup>3</sup>H]5'AMP con un contador de centelleo (Topcount, Packard).

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control.

El compuesto de referencia inhibidor estándar es Ro 20-1724, que se prueba en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calcula su valor de IC50.

- 10 Referencia bibliográfica como arriba.

#### *Ensayo de PDE42A1*

Se usó un ensayo comercial de Cerep (catálogo ref.4074; SOP n°1C1056), que está diseñado para evaluar los efectos de los compuestos sobre la actividad de la fosfodiesterasa-4A1A humana cuantificada midiendo la formación de 5'AMP a partir de cAMP usando una enzima recombinante humana expresada en células Sf9.

- 15 El compuesto de prueba, el compuesto de referencia o el agua (control) se añaden a un amortiguador que contiene Tris/HCl 40 mM (pH 7,4) y MgCl<sub>2</sub> 8 mM, cAMP 450 nM y [<sup>3</sup>H]cAMP 0,25 µCi.

Posteriormente, la reacción se inicia mediante la adición de la enzima (aproximadamente 10 U) y la mezcla se incuba durante 20 min a 22°C.

Para las medidas de control basal, la enzima se omite de la mezcla de reacción.

- 20 Después de la incubación se añaden perlas de SPA.

Después de 30 min a 22°C con agitación, se cuantifica la cantidad de [<sup>3</sup>H]5'AMP con un contador de centelleo (Topcount, Packard).

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control.

- 25 El compuesto de referencia inhibidor estándar es Ro 20-1724, que se prueba en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calcula su valor de IC50.

Referencia bibliográfica como arriba.

Los parámetros adicionales considerados de importancia se determinan de la siguiente manera:

#### *Estabilidad microsómica de método de prueba (depuración intrínseca)*

- 30 Se utiliza un ensayo de estabilidad microsómica para medir *la depuración in vitro* (Clint). El ensayo consiste en medir la tasa de desaparición de un compuesto debido a su actitud intrínseca para ser metabolizado ("intrínseco" significa que la desaparición no se ve afectada por otras propiedades como permeabilidad, unión, etc. que juegan un papel en la cuantificación del aclaramiento *in vivo*). La estabilidad microsomal (aclaramiento intrínseco, Clint) y, por tanto, la estabilidad metabólica se dan generalmente como µl/min/mg de proteína. Puede visualizarse como el volumen de solución que 1 mg de microsomas puede eliminar del compuesto en un minuto.

- 35 Instrumentación

Se usó una estación de trabajo Tecan Genesis (RSP 150/8) para llevar a cabo las incubaciones microsomas. El análisis se llevó a cabo usando un sistema Waters ACQUITY UPLC acoplado a un espectrómetro de masas ABSciex API3000. El análisis de datos se llevó a cabo usando Assay Explorer (Symyx).

## ES 2 984 074 T3

Condiciones de UPLC

Columna: Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm, 1,7  $\mu$ m (Waters)

Fases móviles: A = ácido fórmico al 0,1% en agua; B = acetonitrilo

Tiempo de gradiente	% A	% B
inicial	90	10
0,47	5	95
0,65	5	95
0,66	90	10

Velocidad de flujo: 0,750 ml/min; Detección: ESI, MRM; Inyección: 10  $\mu$ L; Temperatura de la columna: 50 °C

### 5 Químicos

- Amortiguador de fosfato de potasio: amortiguador de fosfato de potasio 0,05 M pH 7,4 que contiene MgCl<sub>2</sub> 1 mM
- NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina): 22,5 mg de NADPH-Na<sub>4</sub> en 1,8 ml de amortiguador de fosfato de potasio
- Acetonitrilo: 50% en volumen de acetonitrilo (1 volumen de acetonitrilo, 1 volumen de agua)

10 • DMSO: 20% en volumen de DMSO en agua

- Solución madre de 20 mg/ml de microsomas de hígado de ratón o humano (proteína)/ml en amortiguador fosfato
- Solución madre de compuesto 10 mM en DMSO al 100%

### Incubación microsomal

15 La dilución de los compuestos de prueba se llevó a cabo en 2 pasos partiendo de una solución madre 10 mM del compuesto respectivo en DMSO al 100%. Se añadieron los primeros 4  $\mu$ l de solución madre a 196  $\mu$ l de DMSO al 20% en volumen. En un segundo paso, se agregaron 10  $\mu$ l de la primera dilución a 1590  $\mu$ l de amortiguador de fosfato de potasio para lograr una concentración final de 1,25  $\mu$ M en la dilución final del compuesto. Por lo tanto, la cantidad de solvente orgánico en el ensayo se mantuvo al mínimo (<1%).

20 La solución de microsoma (proteína) de hígado humano o de ratón que se usará en el ensayo se preparó mezclando 750  $\mu$ l de solución madre (20 mg/ml) y 2250  $\mu$ l de amortiguador de fosfato de potasio hasta una concentración final de 5 mg/ml.

25 La incubación se llevó a cabo en una placa de incubación de 96 pocillos profundos. Se transfirieron 160  $\mu$ l por pocillo de la dilución final del compuesto a la placa de incubación. Se ensayaron cuatro muestras de cada dilución de compuesto. Se añadieron 20  $\mu$ l/pocillo de solución de microsoma hepático a cada pocillo y luego las muestras se preincubaron durante 5 min a 37°C y con agitación de 800 rpm. Se usaron dos compuestos de referencia (verapamilo y dextrometorfano) en paralelo en cada experimento y para cada especie (microsomas humanos o de ratón) para garantizar el rendimiento del sistema y para la comparación.

En una placa de parada separada, se añadieron 160  $\mu$ l de acetonitrilo por pocillo.

30 Después de la preincubación, es decir, en el tiempo  $t_1 = 0$  minutos, se transfirieron muestras de 18  $\mu$ l de solución de compuesto incubado y se agregaron por pocillo (que contenía acetonitrilo) en la placa de parada para evitar una reacción (muestras de control de 0 minutos, 4 muestras por compuesto). Igualmente, se transfirieron muestras de 18  $\mu$ l de solución de compuesto de referencia incubada y se agregaron por pocillo (que contenía acetonitrilo) en la placa de parada en el tiempo  $t_1 = 0$  minutos y nuevamente después de 30 minutos ( $t_4$ ), se verificó la solubilidad y estabilidad química del compuesto.

35 Para iniciar la reacción, se añadieron 26  $\mu$ l de solución de NADPH (cofactor) a todos los pocillos que comprendían

una dilución de compuesto preincubado o una solución de referencia, con la excepción de los pocillos que comprendían una dilución de compuesto preincubado que iban a usarse como muestras de control de 30 minutos, en donde 26 µl de fosfato en su lugar se agregó un amortiguador. A continuación, se continuó la incubación a 37°C y agitación a 800 rpm.

- 5 En las soluciones de ensayo finales (es decir, en cada pocillo que comprende una solución de compuesto, microsomas (proteína) y NADPH respectivamente amortiguador fosfato), la concentración final de proteína fue de 0,5 mg/ml y la concentración de compuesto 1 mg/ml.

10 Después de  $t_2 = 5$  minutos,  $t_3 = 10$  minutos y  $t_4 = 20$  minutos de tiempo de incubación (es decir, después del inicio de la reacción), se transfirieron y agregaron por pocillo muestras de 20 µl de solución de compuesto incubado (4 muestras por compuesto) y solución de compuesto de referencia de acetonitrilo en la placa de tope.

Después de  $t_4 = 30$  minutos de tiempo de incubación, muestras de 20 µl de solución de compuesto incubada (4 muestras por compuesto) y muestras de 20 µl de las muestras de control de 30 minutos (que contienen amortiguador en lugar de NADPH), así como muestras de 20 µl de solución de compuesto de referencia incubada se transfirieron y se añadieron por pocillo de acetonitrilo en la placa de parada.

- 15 Las muestras apagadas se centrifugaron a 4000 g durante 1 h a 4°C. Se transfirieron 80 µl del sobrenadante a placas de 96 pocillos para su análisis por LC-MS/MS.

Análisis de los datos

20 La estabilidad microsómica/metabólica de cada compuesto se determinó midiendo el cambio en el área del pico de LC-MS/MS a lo largo del tiempo. Los datos se ajustan de acuerdo con un modelo logarítmico lineal de acuerdo con Michaelis/Menten. El valor de Clint se calcula a partir de la pendiente (k) de la gráfica de concentración transformada logarítmica lineal por tiempo dividida entre la cantidad de microsomas (0,5 mg/ml):  $Clint (\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg de proteína}) = k \cdot 1000 / \text{concentración de proteína}$ . Se usó el software Assay Explorer para calcular automáticamente la pendiente k del declive.

*ACTIVIDAD DEL CANAL DE IONES Kv11.1 (hERG) (ensayo de pinza de parche)*

- 25 Método para la detección y caracterización de sustancias de ensayo que interfieren con el canal Kv11.1 (hERG): Kv11.1 (hERG, gen del éter humano relacionado con go-go) es un canal de potasio que desempeña un papel fundamental en la repolarización de las células. en los miocitos ventriculares.

La medición de la pinza de parche se llevó a cabo a temperatura ambiente en la configuración de células completas en células de riñón embrionario humano (HEK293) que se han transfectado de manera estable con el gen hERG.

- 30 Las configuraciones de células completas se llevaron a cabo usando un dispositivo de pinza de parche automatizado (Patchliner™, Nanion Technologies, Munich). Se trata de un sistema con base en chips de vidrio con el que es posible realizar mediciones automáticas de células completas en hasta 8 células simultáneamente. El chip de vidrio tiene un orificio de tamaño definido al que se transfiere la celda al Gigaseal mediante la aplicación de una presión reducida y se lleva a la configuración de celda completa. Se añadieron amortiguador, suspensión celular y sustancias de prueba a los microcanales del chip usando una pipeta recubierta de teflón.

35 Las células se sujetaron a un potencial de retención de -80 mV. Para la medición de la inhibición promovida por sustancias del canal Kv11.1, se aplicó el siguiente protocolo de voltaje a intervalos de 10 segundos: 51 ms/-80 mV, 500 ms/+40 mV, 500 ms/-40 mV, 200 ms/-80 mV. La corriente de fuga se resta mediante el método P4. Las células se resuspendieron en amortiguador extracelular (EC) y se aplicaron al chip. Una vez recolectada la célula, se mejoró el sellado mediante la adición de un amortiguador potenciador del sellado. Tan pronto como se alcanzó la configuración de célula completa, el amortiguador potenciador del sello se lavó y se reemplazó por amortiguador extracelular. La medición se inició en EC durante 1,5 min. A continuación, se aplicó DMSO (control de vehículo, 0,1% de DMSO) y se registró la corriente de control durante 3 min. A continuación, se añadió dos veces la sustancia de ensayo en la misma concentración y se midió la corriente de potasio durante 3,5 min en cada caso.

- 45 Si el resultado de la medición de una sustancia de prueba a una concentración inicial de 10 µM fue menor que (-) 50% de efecto (valor umbral) (por ejemplo (-) 60% de efecto), la sustancia de prueba fue, para determinar una relación dosis/acción, añadida acumulativamente en concentración creciente, en donde cada concentración se midió durante 5 minutos.

50 La sustancia de referencia usada fue la quinidina, bloqueador de los canales iónicos Kv11.1 (hERG). Los efectos de las sustancias de prueba y la quinidina se estandarizaron para el control del vehículo asociado. El efecto sobre la actividad del canal Kv11.1 (hERG) se evaluó a partir de la corriente de potasio a -40 mV. Para el cálculo, se

evaluó la corriente para la traza final respectiva. Se estandarizó una inhibición inducida por la sustancia de ensayo del canal Kv11.1 (hERG) para el control del vehículo (0,1% de DMSO).

Durante la medición, se tomó una alícuota de la sustancia de prueba para determinar la concentración. La muestra se midió inmediatamente por HPLC y la concentración final se determinó a partir de una curva de calibración.

- 5 Si el resultado de la medición de una sustancia problema a una concentración inicial de 10 µM es mayor o igual a (-) 50% de efecto (valor umbral) (por ejemplo (-) 30% de efecto, es decir, 30% de inhibición a 10 µM), se calcula la  $K_i$  de acuerdo con la siguiente fórmula:  $K_i = 1,0E-5 \times (100 + \% \text{ de efecto}) / (-\% \text{ de efecto})$ , [M].

El resultado de la medición de (-)30% de efecto a una concentración de sustancia de prueba de 10 µM da una  $K_i$  de 23 µM.

10 *Enzimas del citocromo P-450 (CYP)*

En el organismo humano, las sustancias farmacológicas se convierten en compuestos solubles en agua por sistemas enzimáticos para facilitar su excreción. Estos sistemas enzimáticos incluyen enzimas del citocromo P-450 microsomales, CYPs para abreviar. El ensayo está diseñado para identificar si un compuesto puede ser un inhibidor fuerte de isoformas de CYP definidas. Esto implica el uso de isoformas de CYP recombinantes y su reductasa obtenidas por sobreexpresión en células de insectos infectadas con baculovirus. La reacción de CYP se lleva a cabo mediante la inhibición de la isoforma de CYP que se está probando junto con un sustrato de CYP luminométrico en condiciones de regeneración de NADPH. Los sustratos luminométricos P450-Glo™ son derivados de *luciferina de escarabajo* (ácido (4S)-4,5-dihidro-2-(6-hidroxibenzotiazolil)-4-tiazolcarboxílico o D-luciferina), un sustrato de luciferasa de *luciérnaga* de escarabajos. Los sustratos luminométricos P450-Glo™ no reaccionan directamente con la luciferasa, sino que la isoforma CYP respectiva los convierte en un producto de luciferina que es luminiscente al reaccionar con el reactivo de detección de luciferina (LDR). Esto permite cuantificar rápidamente la actividad enzimática a través de la luminosidad. El grado de inhibición se mide determinando el valor de IC50 (Crespi et al., *Methods Enzymol.* 357: 276-284, 2002). Se usan los siguientes sistemas/ensayos de tamizado disponibles comercialmente: Sistema de tamizado P450-Glo™ CYP1A2 (Promega Corporation; V9770); Ensayo P450-Glo™ CYP2C8 (Promega Corporation; V8782); Sistema de tamizado P450-Glo™ CYP2C9 (Promega Corporation; V9790); Sistema de tamizado P450-Glo™ CYP2C19 (Promega Corporation; V9880); Sistema de tamizado P450-Glo™ CYP2D6 (Promega Corporation; V9880); Sistema de detección P450-Glo™ CYP3A4 (Luciferin-PPXE) (Promega Corporation; V9910).

*Biodisponibilidad*

- 30 La biodisponibilidad predicha en humanos se deriva de las biodisponibilidades medidas en las especies preclínicas: ratón, rata y perros (Beagle) y se calcula para la dosis farmacológicamente efectiva predicha en humanos (simulación in silico de GastroPlus).

*Método de difracción de rayos X en polvo (PXRD):*

35 Los difractogramas de rayos X en polvo (XRPD), tal como los que se muestran en las figuras 7B y 10 a 19 (y otras), se obtuvieron usando la siguiente metodología: Las muestras se prepararon en una placa combinatoria de 96 pocillos (que comprende una placa de rayos X lámina amorfa como fondo), o entre películas amorfas de rayos X. Las mediciones se han realizado en geometría de transmisión con radiación Cu-Kα1 en un difractómetro Stoe StadiP 611. Los escaneos fueron de 0-36° 2θ simultáneamente (ancho de paso de 0,03° 2θ, 30 segundos por paso), o cubriendo 1-65° 2θ (ancho de paso de 0,015° 2θ, 15 segundos por paso), respectivamente.

40 *Difracción de rayos X de cristal único:*

Los datos de la estructura de rayos X monocristalino se obtuvieron usando un difractómetro SuperNova de Agilent, equipado con un detector CCD que usa radiación Cu Kα. Las mediciones se llevaron a cabo a 200 K (Forma H2) o 298 K (Formas A1, A2, A3, H1), respectivamente. Los datos monocristalinos se usaron para la determinación del sistema cristalino y los parámetros de la celda unitaria.

45 *Calorimetría diferencial de barrido (DSC):*

Los barridos de DSC se adquirieron en un calorímetro de barrido diferencial de flujo de calor Mettler-Toledo con muestreador automático, usando una atmósfera de gas inerte de nitrógeno (50 ml/min). Se llevaron a cabo barridos generales en recipientes de Al 40 µL con tapas abiertas desde 25-300°C a 5°C/min.

*Análisis termogravimétrico (TGA):*

Las exploraciones de TGA se adquirieron en un analizador termogravimétrico Mettler-Toledo con muestreador automático, usando una atmósfera de gas inerte de nitrógeno (50 ml/min). Se llevaron a cabo exploraciones generales en recipientes de Al 100 µL sin tapa desde 25-300°C a 5°C/min. Los experimentos se corrigieron en la línea de base con un ensayo en blanco de un recipiente vacío de 100 µl de Al sin tapa, usando el mismo perfil de temperatura.

5

*Absorción dinámica de vapor (DVS):*

Las isotermas de sorción de vapor de agua DCS se adquirieron en un instrumento DVS con microbalanza e incubadora (DVS-Intrinsic, Surface Measurement Systems, SMS). Las muestras de polvo se pesaron con precisión en bandejas de Al desechables y se colocaron en la posición de muestra del instrumento DVS. Para la humidificación se usó una velocidad de seguimiento global de nitrógeno de 200 ml/min (corriente seca y húmeda combinada). Las isotermas de sorción de vapor de agua se adquirieron a 25°C, usando un segmento de desorción inicial 1 de 40% HR (humedad relativa) a 0% HR (con pasos de 10% HR), un segmento de adsorción de 0% HR a 98% HR (con Pasos de 10% de HR y un paso final de 8% de HR, respectivamente), y un segmento de desorción final 2 de 98% de HR a 0% de HR (con un paso inicial de 8% de HR y pasos de 10% de HR, respectivamente). Para todos los pasos de HR, se usó una condición de equilibrio de  $dm/dt \leq 0,0005\%$  en peso/min, con un tiempo de paso de HR mínimo de 10 minutos y un tiempo de paso de HR máximo (tiempo de espera) de 360 minutos.

10

15

*Perfiles de disolución sin hundimiento de formas de estado sólido:*

Los perfiles de disolución sin hundimiento para formas de estado sólido se adquirieron usando el método de matraz agitado con exceso de material sólido en medio FaSSIF (pH 6,5) con muestreo resuelto en el tiempo para la determinación de cantidades disueltas de API.

20

Se pesaron aproximadamente 10-20 mg de muestra sólida en viales de vidrio. Se añadieron 7 ml del medio respectivo (precalentado a 37°C) y la suspensión se agitó a 450 rpm a 37°C. Después de 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 24 h y 48 h, se extrajo 1 ml de suspensión y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm. El filtrado transparente se analizó por HPLC después de una dilución adecuada para medir la cantidad de compuesto/forma (también puede denominarse API) disuelto.

25

FaSSIF: taurocolato de sodio 3 mM; Lecitina 0,75 mM; Cloruro de sodio 105,9 mM; Fosfato de sodio monobásico 28,4 mM e hidróxido de sodio 8,7 mM, pH 6,5

*Método de HPLC para la solubilidad dependiente del pH y la disolución no hundida miniaturizada:*

Los niveles de compuesto/forma disueltos se analizaron por HPLC, con las siguientes condiciones:

30

- Columna: Chromolith RP-18e 100 - 3 mm
- Solvente A: agua/ácido fórmico (999: 1; v/v)
- Solvente B: acetonitrilo/ácido fórmico (999: 1; v/v)
- Volumen de inyección: 5 µL
- Temperatura de la columna: 37 °C

35

• Gradiente de HPLC:

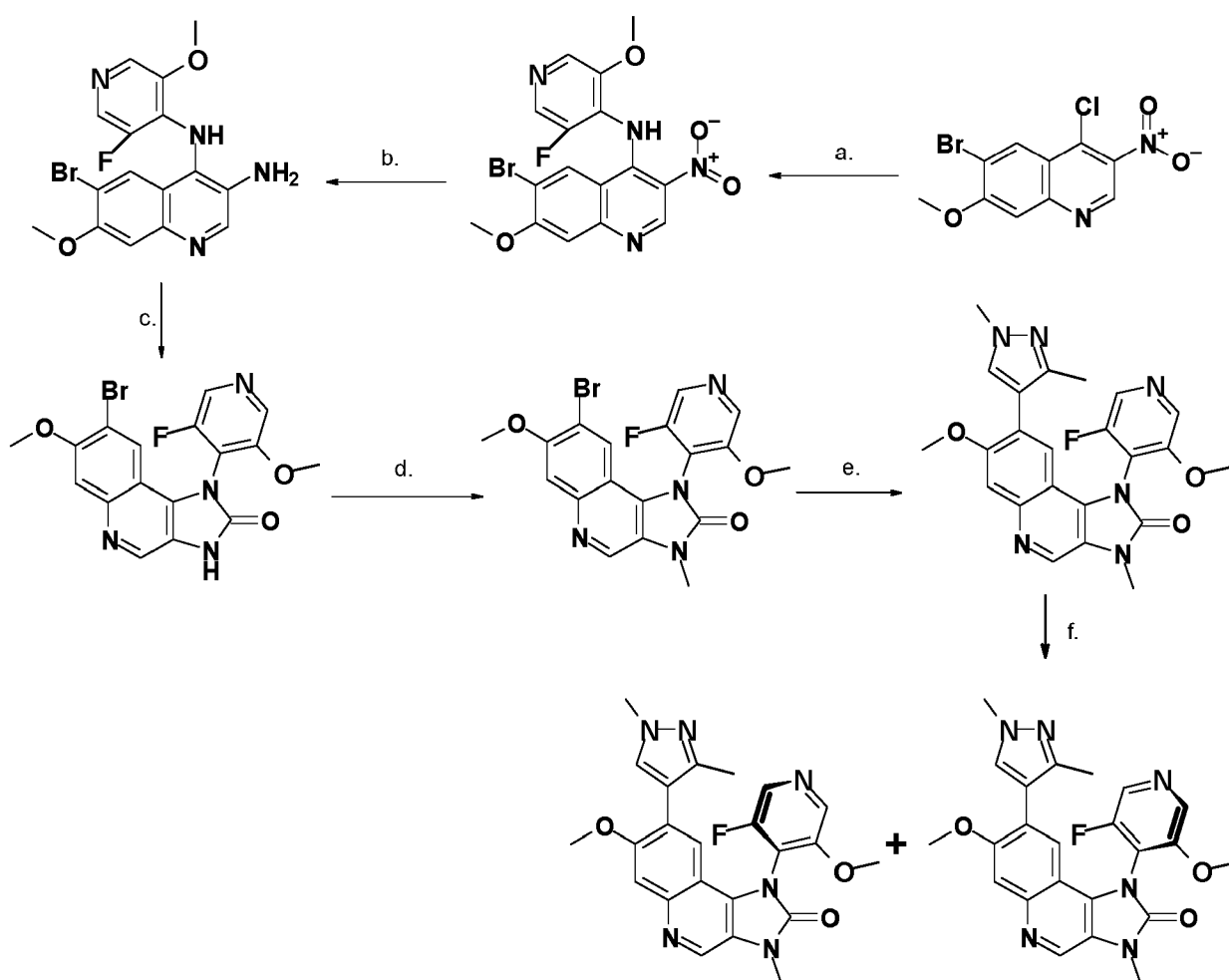
Tiempo (minutos)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	Flujo (mL/min)
0,0	90	10	1,7
0,3	90	10	1,7
2,0	10	90	1,7
2,75	10	90	1,7

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención descrita anteriormente; sin embargo, no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Los Ejemplos deben interpretarse, en particular, de tal manera que no se limiten a las características o combinaciones de características específicamente ilustradas, sino que las características ilustrativas pueden modificarse o combinarse libremente siempre que se logre el objeto de la invención. Los efectos beneficiosos de los compuestos, combinaciones y composiciones de la presente invención también pueden determinarse mediante otro método analítico y configuraciones experimentales conocidas como tales por el experto en la técnica pertinente. Asimismo, las modificaciones de los métodos de preparación, en particular las condiciones de reacción, serán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

10 **Ejemplo 1:** Preparación de los Compuestos 1 y 2

El Compuesto Y se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2016/155844, seguido de la separación de los Compuestos 1 y 2 a partir del compuesto Y:



## a. Síntesis de 6-bromo-N-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-nitro-quinolin-4-amina

En una atmósfera de nitrógeno seco, se proporcionó una solución de 3-fluoro-5-metoxipiridin-4-amina (447 mg, 3,02 mmol) disuelta en N,N-dimetilformamida (5 ml). Luego, se añadió hidruro de sodio (504 mg, 12,6 mmol, 60%) a la solución y se continuó agitando durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 6-bromo-4-cloro-7-metoxi-3-nitro-quinolina (800 mg, 2,52 mmol) a la mezcla de reacción, seguida de 15 minutos de agitación a temperatura ambiente, luego inactivación de la reacción mediante adición de agua helada (100 mL). El precipitado se separó por filtración, se lavó con agua helada y se secó para dar 1,00 g (94%) de 6-bromo-N-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-nitro-quinolin-4-amina como un sólido amarillo.

b. Síntesis de 6-bromo-N<sup>4</sup>-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-quinolin-3,4-diamina

Se proporcionó 6-bromo-N-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-nitro-quinolin-4-amina (990 mg, 2,20 mmol) disuelta en metanol (100 ml) en una atmósfera protectora de nitrógeno. Luego, se añadió Raney-Ni (100 mg, 1,17 mmol) a la solución y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos bajo una atmósfera de hidrógeno a presión normal. Después de introducir nitrógeno, la suspensión se filtró y el filtrado se secó al vacío. El filtrado se evaporó hasta sequedad al vacío. El residuo se cristalizó en una mezcla de acetato de etilo/éter de petróleo, produciendo 0,86 g (99%) de 6-bromo-N<sup>4</sup>-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-quinolin-3,4-diamina como un sólido amarillo.

c. Síntesis de 8-bromo-1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

Se proporcionó una solución de 6-bromo-N<sup>4</sup>-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-quinolin-3,4-diamina (0,85 g, 2,20 mmol) disuelta en tetrahidrofurano (20 ml). Luego, se añadieron 1,1'-carbonildiimidazol (1,84 g, 11,3 mmol) y base de Hünig (1,46 g, 11,3 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 40°C y se agitó durante 16 horas. Después, la reacción se inactivó mediante la adición de agua helada (200 ml). El precipitado se separó por filtración, se lavó con agua helada y se secó para dar 0,87 g (94%) de 8-bromo-1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido amarillo claro.

d. Síntesis de 8-bromo-1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

En una atmósfera de gas nitrógeno protector seco, se proporcionó 8-bromo-1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (0,86 g, 1,94 mmol) disuelta en N,N-dimetilformamida (5 ml). Luego, se añadieron hidruro de sodio (388 mg, 9,71 mmol, 60%) y yoduro de metilo (2,76 g, 19,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, la reacción se detuvo mediante la adición de agua helada (100 ml). El precipitado resultante se filtró y se secó al vacío para dar 0,70 g (80%) de 8-bromo-1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido amarillo claro.

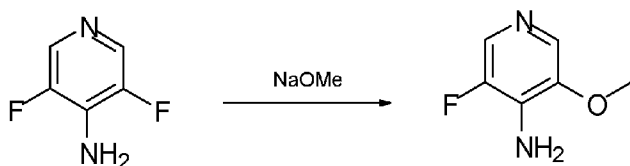
e. Síntesis de 1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

Bajo una atmósfera de gas inerte de argón en equipo cerrado se proporcionaron 8-bromo-1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (150 mg, 0,33 mmol), 1,3-dimetil-4-(tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (88,4 mg, 0,40 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (76,6 mg, 0,07 mmol) y carbonato de potasio (91,6 mg, 0,66 mmol) en 1,4-dioxano (15 ml) y agua (5 ml). La mezcla de reacción se calentó a 80°C con agitación durante 2 horas. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se redujo la mezcla de reacción a sequedad al vacío. El residuo se purificó cromatográficamente usando sílice (acetato de etilo/metanol = 97:3, partes en volumen). El eluato se redujo a sequedad y el producto bruto resultante se purificó mediante RP-HPLC preparativa (agua/acetoneitrilo). Después de reducir las fracciones del producto, 1-(3-fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (70 mg, 47%) se obtuvo como un sólido incoloro.

f. Separación de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Ra)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona y 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

1-(3-Fluoro-5-metoxi-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-8-(1,3-metilpirazol-4-il)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (50,0 mg, 0,11 mmol) como se obtuvo anteriormente se separó mediante HPLC quiral usando SFC para dar los Compuestos 1 y 2. La sustancia se aplicó a la columna quiral Lux Cellulose-2 y se separó a un flujo de 5 ml/min con CO<sub>2</sub>/2-propanol + dietilamina al 0,5% (75:25) como solvente y usando detección a una longitud de onda de 240 nm. La reducción de las fracciones de producto a presión reducida proporcionó 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Ra)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (25,0 mg, 50%) y 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (22,1 mg, 44%), ambos como sólidos incoloros.

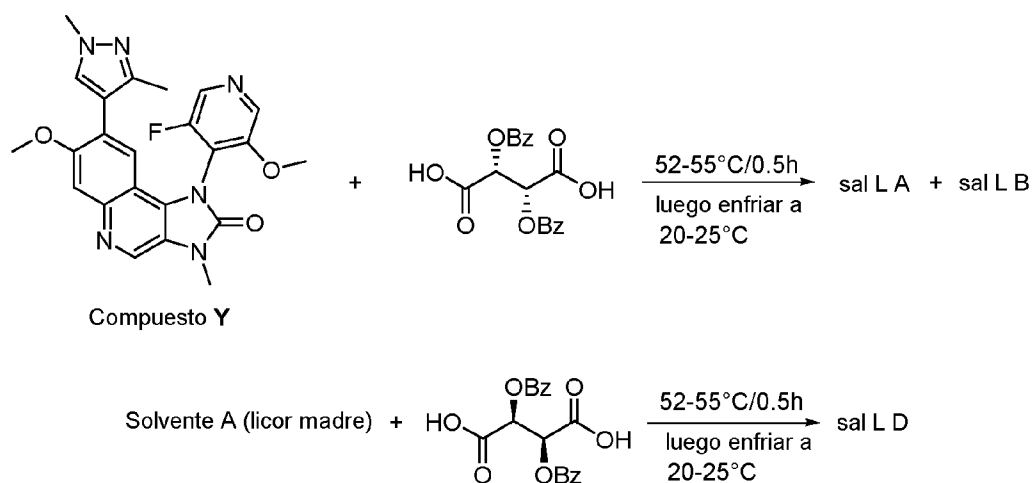
Los compuestos de partida se pueden obtener fácilmente, por ejemplo, tal como se muestra a continuación:



### Ejemplo 2: Aislamiento de los atropisómeros y purificación del Compuesto 1

5 Los Compuestos 1 y 2 pueden aislarse del Compuesto Y como se muestra en el Esquema de reacción 1 y en la figura 6 y como se describe en detalle a continuación. Un experto en la técnica apreciará que el proceso descrito a continuación es igualmente aplicable para los compuestos 3-a y 3-b a partir de 3, 4-a y 4-b a partir de 4, así como 5-a y 5-b a partir de 5, Esquema de reacción 1: preparación de las sales quirales

*Esquema de reacción 1: preparación de las sales quirales*



*Paso 1:*

- 10 1. En un reactor de 200 L, se añadieron acetona (108 L, 20 vol.), Agua purificada (8,13 L, 1,5 vol.) y Compuesto Y (5,42 kg, 1,0 eq.) A 20~25°C.
2. Cargado con ácido dibenzoil-L-tartárico (4,33 kg, 1,0 eq.).
3. Calentado a 52-55°C para dar una solución transparente, agitado durante 0,5 h a 52-55°C.
4. Enfriado a 20~25°C.
- 15 5. Torta de filtración filtrada y lavada con acetona (5,4 l, 1 vol.) Una vez.
6. Se recogió la torta y se secó para dar la sal L B (sal L del Compuesto 2) (sólido amarillo claro con 95,9% de pureza quiral).

## ES 2 984 074 T3

7. Se concentró la solución madre y se obtuvo la sal LA (sal L del Compuesto 1).
  8. En un reactor de 100 l se añadió L-sal A y DCM (38 l, 7 vol.), el pH se ajustó a 8-9 con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>.
  9. Se recogió la capa de diclorometano (DCM), se extrajo el NaHCO<sub>3</sub> saturado con DCM (16,3 l, 3 vol.), se combinaron las capas de DCM, se lavó la capa de DCM con H<sub>2</sub>O (10,8 l, 2 vol.).
  10. Se concentró la capa de DCM. Luego, se añadió acetona (5,4 l, 1 vol.) A 20~25°C.
  11. Agitado a 20~25°C durante 1h.
  12. Se filtró, se recogió la torta y se secó para dar el Compuesto 1 (3,50 kg, sólido blanco con 73,2% de pureza quiral, R: 64,6%).
- 10 *Paso 2:*
1. En un matraz de 50 l se añadió L-sal B y DCM (16,2 l, 3 vol.), El pH se ajustó a 8-9 con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>.
  2. Se recogió la capa de DCM, se extrajo la capa acuosa con DCM (5,4 l, 1 vol.), se combinaron las capas de DCM, se lavó la capa de DCM con H<sub>2</sub>O (5,4 l, 1 vol.).
- 15 3. Se intercambió el DCM con 2-etoxietanol (1,8 L, 0,3 vol.) dos veces al vacío a 40~50°C.
4. Se ajustó el volumen con 2-etoxietanol a 5,4 L (1 vol.).
  5. Calentado a 128-130°C para dar una suspensión, agitado durante 44 h a 128-130°C.
  6. IPC (relación 49,5: 50,5).
  7. Enfriado a 15~20°C.
- 20 8. Se filtró y se lavó la torta con metil-terc-butil-éter (2,7 l, 0,5 vol).
9. Se recogió la torta y se secó para dar el Compuesto Y (1,60 kg, sólido blanquecino, rendimiento global: 29,5%).
- Paso 3:*
1. En un reactor de 100 L se añadió acetona (70 L, 20 vol.) A 20~25°C, se agitó y se añadió Compuesto 1 (3,5 kg, 1,0 eq.), se añadió agua (5,3 L, 1,5 vol.).
- 25 2. A 35~40°C, calentado a 52~55°C para dar una solución transparente, agitado durante 0,5 h a 52~55°C.
3. Se enfrió a 20~25°C con baño de aceite y se agita durante 17 h a 20~25°C.
  4. Se filtró y se lavó la torta con acetona (3,5 L, 1 vol.).
  5. Se recogió la torta para dar la sal DA (sal D del Compuesto 1) (sólido amarillo claro con 98,7% de pureza quiral).
- 30 6. Se concentró la solución madre, luego se añadió una solución saturada de NaHO<sub>3</sub> (15,5 L, 3,5 vol.) y H<sub>2</sub>O (15,5 L, 3,5 vol.).
7. Se agitó durante 0,5 h a 20~25°C.
  8. Se filtró y se lavó la torta con H<sub>2</sub>O (3,5 L, 1 vol.).
  9. Se recogió la torta de filtración y se secó para dar el Compuesto Y (1,53 kg, sólido blanco con una relación de 50,3: 49,7, Y: 43,7%).

**Paso 4:**

1. En un reactor de 50 L se añadió D-sal A (D-sal del Compuesto 1) y acetona (17,5 L, 5 vol.), se calentó a 52~55°C para dar una solución en suspensión, se agitó durante 0,5 h a 52~55°C.
2. Se enfría a 20~25°C y se agita durante 17 h a 20~25°C.
3. Se filtró y se lavó la torta con acetona (3,5 L, 1 vol).
- 5 4. Se recogió la torta de filtración y se secó para dar la sal D A (3,23 kg, sólido amarillo claro con 99,2% de pureza quiral).
5. En un reactor de 50 L se añadió D-sal A, luego se añadió una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (16 L, 5 vol.) y H<sub>2</sub>O (16 L, 5 vol.).
6. Se agitó durante 0,5 h a 20~25°C.
- 10 7. Se filtró y se lavó la torta con H<sub>2</sub>O (16 L, 5 vol.).
8. Se recogió la torta y se secó para dar el Compuesto 1 (1638 g, sólido blanco con 99,1% de pureza quiral y 99,9% de HPLC, rendimiento total: 30,2%).

**Ejemplo 3:** Separación, purificación y análisis cromatográficos

- 3.1 Los Compuestos 1 y 2 se pueden aislar a partir del Compuesto Y usando cromatografía en una fase estacionaria quiral (ver, por ejemplo, Chiral Liquid Chromatography; W. J. Lough, Ed. Chapman and Hall, Nueva York, (1989); Okamoto, "Optical resolution of dihydropyridine enantiomers by high-performance liquid chromatography using phenylcarbamates of polysaccharides as a chiral stationary phase", J. of Chromatogr. 513:375-378, (1990)). Los Compuestos 1 y 2 se pueden aislar mediante cromatografía en fase estacionaria quiral, por ejemplo, una columna Chiralpak IC (5 mm, 150 x 4,6 mm ID), por ejemplo, usando elución isocrática con una fase móvil que contiene: H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 v/v (ACN: acetonitrilo; v: volumen). Un experto en la materia apreciará que se puede aplicar el mismo procedimiento para los compuestos 3-a y 3-b, 4-a y 4-b así como 5-a y 5-b.

Un cromatograma así obtenido se ilustra en la figura 5 (columna y elución como se mencionó anteriormente, flujo 1,00 ml/min; UV a 260 nm; T<sub>c</sub> y T<sub>s</sub>: 25 ± 5°C, Sconc 0,20 mg/ml; volumen inyectado 10 ml)

- 3.2 Como alternativa a las condiciones de SFC mencionadas anteriormente, se puede usar la cromatografía de fluidos supercríticos preparativa, que incluya, por ejemplo: columna Chiralpak AS-H (20 mm x 250 mm, 5 µm); elución isocrática (20:80 etanol: CO<sub>2</sub> con 0,1% v/v de NH<sub>3</sub>), BPR (reg. de contrapresión): aproximadamente 100 bar por encima de la presión atmosférica; una temperatura de columna de 40°C, un caudal de 50 ml/min, un volumen de inyección de 2500 µl (125 mg) y una longitud de onda del detector de 265 nm.

- 3.3 Para el análisis de la pureza de los respectivos atropisómeros, nuevamente, se puede aplicar SFC, por ejemplo usando la siguiente configuración: columna Chiralpak AS-H (4,6 mm x 250 mm, 5 µm); elución isocrática (20:80 etanol: CO<sub>2</sub> con 0,1% v/v de NH<sub>3</sub>), BPR (reg. de contrapresión): aproximadamente 125 bar por encima de la presión atmosférica; una temperatura de columna de 40°C, un caudal de 4 ml/min, un volumen de inyección de 1 µl y una longitud de onda del detector de 260 nm.

**Ejemplo 4:** Estabilidad de los Compuestos 1 y 2

- 35 *Cálculos de mecánica cuántica de barreras rotacionales*

- LaPlante *et al.*, (ChemMedChem, 2011, 6 (3), 505-513) describen un flujo de trabajo de mecánica cuántica para estimar las barreras de energía a la rotación axial de moléculas similares a fármacos. Se aplicó un enfoque similar: las estructuras 3D de todas las moléculas de entrada se han generado usando CORINA (Corina versión 3,6, Molecular Networks, Alemania) y posteriormente se han minimizado con Macromodel (versión 11.1, Schrödinger. LLC, Nueva York, NY). Sobre la base de estas estructuras de entrada, se calcularon las barreras de energía rotacional a partir de escaneos de ángulos diedros relajados usando el programa Jaguar (versión 9,1 versión 14, Schrödinger. LLC, Nueva York, NY) empleando el método B3LYP/6-31G\*\* con un incremento del ángulo de torsión de 15°. Las estructuras se optimizaron antes del escaneo de torsión usando el mismo nivel de teoría. Se han usado parámetros predeterminados, excepto que el número máximo de pasos de minimización se estableció en 500 y se introdujo el indicador stop\_rxn para evitar rupturas de unión artificiales. Para todos los cálculos, se han usado fragmentos moleculares representativos. El diedro obtenido de la estructura minimizada de la mecánica molecular se ha usado para definir el valor inicial para la exploración diedro, por ejemplo, para el Compuesto 1 de esta invención o para el "Compuesto de referencia 1 de LaPlante" los valores se han establecido en 47,32° y 35,8°

respectivamente. Para cada torsión alrededor del enlace axial, los valores de energía QM se han calculado en 24 pasos. El perfil de torsión se ha obtenido trazando los valores del ángulo de torsión a las energías calculadas. Se ha determinado la barrera de energía más baja para cada compuesto que permite la interconversión entre ambos isómeros. Para los compuestos de referencia 1-6 se conocen tasas de interconversión determinadas experimentalmente y barreras energéticas deducidas. Las barreras de energía computacional para los compuestos de referencia 1-6 están entre 9,865 y 31,316 kcal/mol. Estos valores se han ajustado a las tasas de interconversión determinadas experimentalmente.

Los cálculos para el Compuesto 1 de esta invención y el Compuesto 2 de esta invención revelaron una alta barrera rotacional prevista de 29,205 kcal/mol que se traduce en un atropisómero muy estable con una semivida rotacional prevista en el intervalo de años (> 10 años). La temperatura requerida para el inicio de la racemización de cualquiera de los atropisómeros enantioméricos es >100°C.

Un experto en la técnica apreciará que estos valores también son ejemplares para los compuestos 3-a y 3-b, 4-a y 4-b, así como 5-a y 5-b.

#### **Ejemplo 5:** Sales farmacéuticamente aceptables del Compuesto 1

- 15 Las sales del Compuesto 1 (Compuestos 1-a), que son farmacéuticamente aceptables, se prepararon como se muestra y se comenta en detalle a continuación.

##### *Preparación de fumarato-sal (Forma NF6):*

Aprox. 20 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona se disolvieron en 1 ml de THF a 50°C (grado p. a.) en un vial de vidrio de 4 ml con tapón cerrado, equipado con una barra de agitación magnética y usando un agitador magnético. A 50°C, se añadieron aprox. 5,7 mg de ácido fumárico (~1,1 eq.) a la solución caliente y se enfrió a 5°C a una velocidad de enfriamiento de 0,1 K/min. La mezcla se calentó repetidamente a 50°C (en aproximadamente 30 min) y se enfrió a 5°C (a 0,1 K/min) con agitación, antes de un paso de equilibrio final a 5°C durante varias horas. Para aumentar el rendimiento de la formación de sal en la solución enfriada, la mezcla se expuso adicionalmente a una difusión de vapor antisolvente lenta de n-pentano en una configuración de vial cerrado. El material sólido finalmente obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente bajo una purga de nitrógeno.

##### *Preparación de sal napsilato (Forma NF7) - Alternativa 1:*

Aprox. 10 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona se disolvieron en ~250 µL de acetona a 50°C (grado p. a.) en un vial de vidrio de 4 ml con tapón cerrado, equipado con un agitador magnético barra, y usando un agitador magnético. A 50°C, se añadieron aproximadamente 5,6 mg de ácido naftaleno-2-sulfónico (~1,2 eq.) a la solución caliente y se enfrió a 5°C a una velocidad de enfriamiento de 0,1 K/min. La mezcla se calentó repetidamente a 50°C (en aproximadamente 30 min) y se enfrió a 5°C (a 0,1 K/min) con agitación, antes de un paso de equilibrio final a 5°C durante varias horas. El material sólido finalmente obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente bajo una purga de nitrógeno.

##### *Preparación de sal napsilato (Forma NF7) - Alternativa 2:*

Aprox. 11,5 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona se disolvieron en ~250 µL de THF (tetrahidrofurano) a 50°C (grado p. a.) en un vial de vidrio de 4 ml con tapón cerrado, equipado con una barra de agitación magnética, y mediante el uso de un agitador magnético. A 50°C, se añadieron aproximadamente 6,6 mg de ácido naftalen-2-sulfónico (~1,2 eq.) a la solución caliente y se enfrió a 5°C a una velocidad de enfriamiento de 0,1 K/min. La mezcla se calentó repetidamente a 50°C (en aproximadamente 30 min) y se enfrió a 5°C (a 0,1 K/min) con agitación, antes de un paso de equilibrio final a 5°C durante varias horas. El material sólido finalmente obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente bajo una purga de nitrógeno.

##### *Preparación de sal edisilato (Forma NF8):*

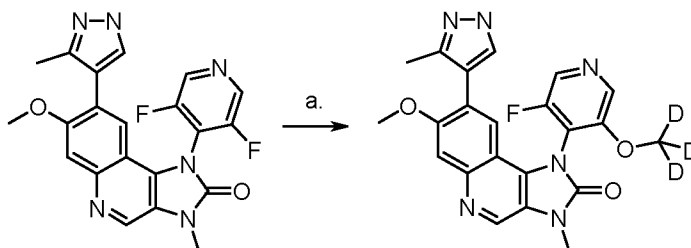
Aprox. 12,6 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona se disolvieron en ~250 µL de acetona a 50°C (grado p. a.) en un vial de vidrio de 4 ml con tapón cerrado, equipado con un agitador magnético barra, y usando un agitador magnético. A 50°C, se añadieron aproximadamente 6,1 mg de ácido etandisulfónico (~1,2 eq.) a la solución caliente y se enfrió a 5°C a una velocidad de enfriamiento de 0,1 K/min. La mezcla se calentó repetidamente a 50°C (en aproximadamente 30 min) y se enfrió a 5°C (a 0,1 K/min) con agitación, antes de un paso de equilibrio final a 5°C durante varias horas. El material sólido finalmente obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente bajo una purga de

nitrógeno.

Parámetro	Fumarato	Napsilato		Edisilato
Estereoquímica sal	de API : Fumarato 1,0:0,9	API : Napsilato 1:1	API : Napsilato 1:1	API: Edisilato 1:1
Punto de fusión	>180°C	~ 209°C	n.d.	~ 223°C

**Ejemplo 6:** Preparación de los Compuestos 3, 4 y 5 (Ejemplos de referencia)

5 *Síntesis de 8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona*



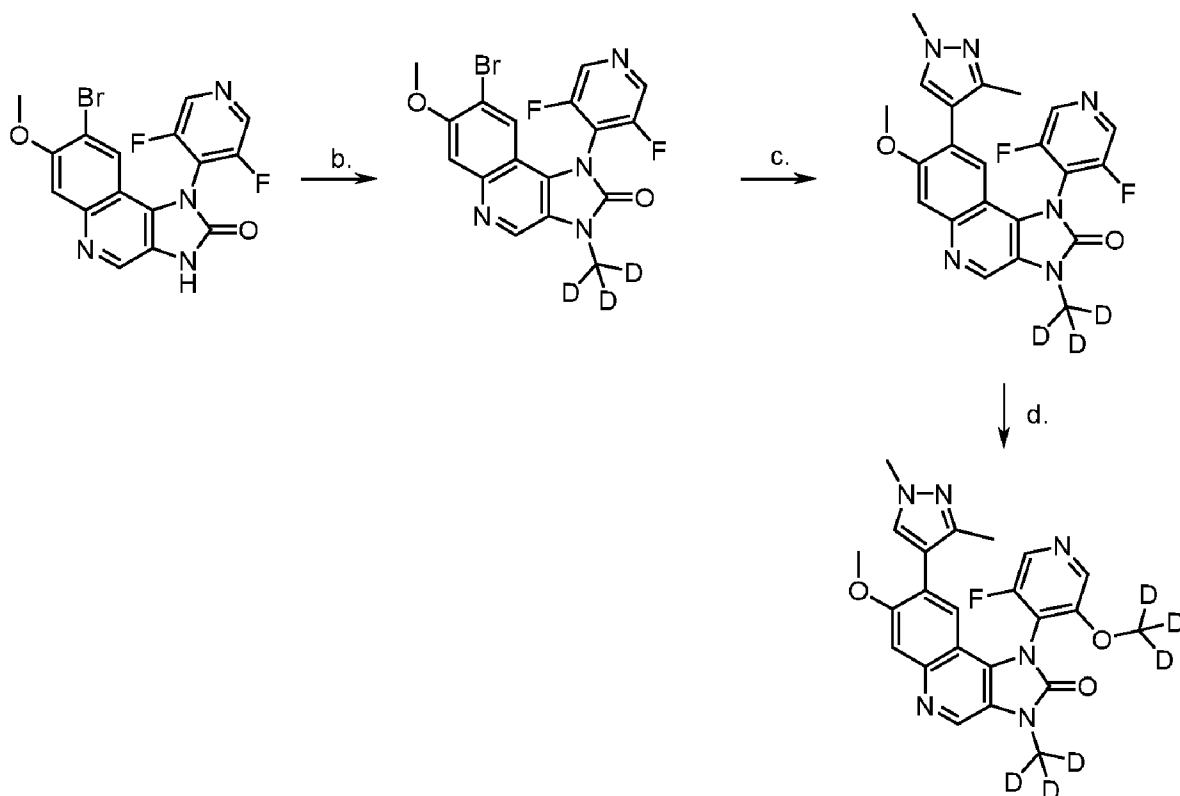
*Paso a:*

10 En un tubo sellado se colocaron: 1-(3,5-difluoropiridin-4-il)-8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-7-metoxi-3-metil-1H,2H,3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (90,0 mg, 0,20 mmol, 95%), carbonato de potasio (85,3 mg, 0,62 mmol), CD<sub>3</sub>OD (0,30 ml, 6,74 mmol), N,N-dimetilformamida (3 ml). La mezcla se agitó durante 1 h a 100°C. Se añadieron 10 ml de agua y la solución resultante se extrajo tres veces con acetato de etilo (10 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y el filtrado se concentró a sequedad al vacío.

15 El residuo bruto se purificó mediante HPLC preparativa (SHIMADZU (HPLC-10): Columna: columna Atlantis Prep T3 OBD, 19 x 250 mm, 10 μm; fase móvil: agua (10 mmol/L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) y acetonitrilo (contener 34% de acetonitrilo durante 10 min); Detector: UV 254 nm) para producir 35 mg (38%) de 8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido blanco. Punto de encuentro 260-262°C. HPLC/MS (pureza) 97%. Rt 1,98 min (método A). [M+H]<sup>+</sup> 452. [M+H]<sup>+</sup> 452, RMN 1H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm = 8,92 (s, 1 H), 8,70 (d, J = 9,5 Hz, 2 H), 7,83 (s, 1 H), 7,54 (s, 1 H), 7,00 (s, 1 H), 3,94 (s, 3 H), 3,78 (s, 3 H), 3,60 (s, 3 H), 1,75 (s, 3 H).

20

Síntesis de 8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-(trideuteriometil)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona



Paso b:

5 En un matraz de fondo redondo se colocó 8-bromo-1-(3,5-difluoropiridin-4-il)-7-metoxi-1H, 2H, 3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (3,00 g, 6,96 mmol, 94%) en N,N-dimetilformamida (50 ml). Se añadió hidruro de sodio (1,39 g, 34,8 mmol, 60%) a 0°C en 5 min, seguido de la adición de CD<sub>3</sub>I (3,18 g, 20,9 mmol, 95%). La solución resultante se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. A la mezcla, se le añadieron 500 ml de agua helada y los sólidos se recogieron por filtración. Esto dio como resultado 2,95 g (99%) de 8-bromo-1-(3,5-difluoro-4-piridil)-7-metoxi-3-trideuteriometilimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido amarillo. HPLC/MS (pureza) 99%. Rt 0,93 min (método B). [M+H]<sup>+</sup> 424, 426.

10 Paso c:

15 En un tubo sellado purgado y mantenido con una atmósfera inerte de argón se colocaron 8-bromo-1-(3,5-difluoro-4-piridil)-7-metoxi-3-trideuteriometilimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (1,80 g, 4,20 mmol, 99%), 1,3-dimetil-4-(tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,97 g, 8,43 mmol, 95%), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (540 mg, 0,42 mmol, 90%), carbonato de potasio (1,22 g, 8,39 mmol, 95%), dioxano (50 ml) y agua (10 ml). La mezcla se agitó durante 2 h a 80°C y se concentró al vacío hasta sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (metanol/acetato de etilo, 13:87) dando como resultado 1,35 g (71%) de 1-(3,5-difluoro-4-piridil)-8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-7-metoxi-3-(trideuteriometil)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido amarillo. HPLC/MS (pureza) 97%. Rt 0,91 min (método C). [M+H]<sup>+</sup> 440.

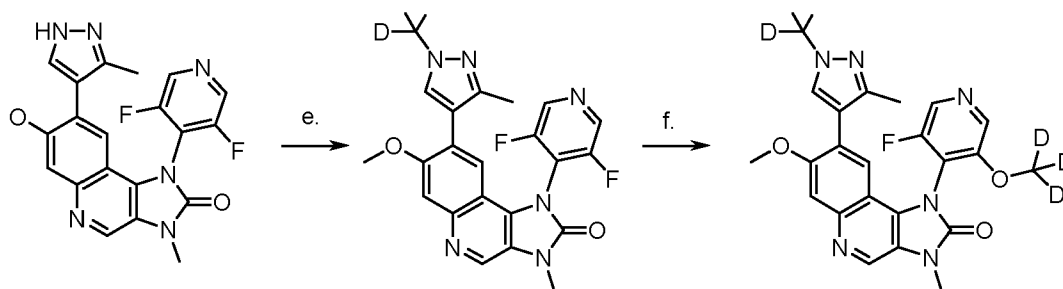
Paso d:

20 En un tubo sellado purgado y mantenido con una atmósfera inerte de argón se colocaron 1-(3,5-difluoro-4-piridil)-8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-7-metoxi-3-(trideuteriometil)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (1,35 g, 2,96 mmol), N,N-dimetilformamida (30 ml), carbonato de potasio (818 mg, 5,92 mmol) y CD<sub>3</sub>OD (2,76 ml, 2,24 g, 62,2 mmol).

25 La mezcla se agitó durante 2 h a 100°C. Se añadieron 100 ml de agua y la mezcla resultante se extrajo tres veces con 200 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con 100 ml de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró a sequedad y el producto bruto se cristalizó en metanol/acetonitrilo (1:25) para producir 1,50 g (66%) de 8-(1,3-dimetilpirazol-4-il)-1-[3-fluoro-5-

(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-(trideuteriometil)imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido blanquecino. Punto de fusión 266-271°C. HPLC/MS (pureza) 97%. Rt 2,00 min (método C). [M+H]<sup>+</sup> 455. [M+H]<sup>+</sup> 455, RMN 1H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm = 8,87 (s, 1 H), 8,65 (d, J = 7,5 Hz, 2 H), 7,78 (s, 1 H), 7,49 (s, 1 H), 6,95 (s, 1 H), 3,89 (s, 3 H), 3,28 (s, 3 H), 1,71 (s, 3 H).

5 *Síntesis de 1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-metil-8-[3-metil-1-(trideuteriometil)pirazol-4-il]imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona*



*Paso e:*

10 En un matraz de fondo redondo, se colocó 1-(3,5-difluoropiridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-8-(3-metil-1H-pirazol-4-il)-1H,2H,3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (890 mg, 1,89 mmol, 90%) en N,N-dimetilformamida (30 ml). Se añadió hidruro de sodio (377 mg, 9,43 mmol, 60%) a 0°C en 5, seguido de CD<sub>3</sub>I (1,44 g, 9,44 mmol, 95%). La mezcla resultante se agitó durante 8 h a temperatura ambiente. Se agregaron 200 ml de agua helada y la solución se extrajo cuatro veces con 200 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con 100 ml de salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró a sequedad y se purificó por cromatografía en columna con diclorometano/metanol (19:1) para producir 400 mg (47%) de 1-(3,5-difluoro-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-8-[3-metil-1-(trideuteriometil)pirazol-4-il]imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido amarillo. HPLC/MS (pureza) 98%. Rt 0,68 min (método D). [M+H]<sup>+</sup> 440.

*Paso f:*

20 En un tubo sellado purgado y mantenido con una atmósfera inerte de argón se colocaron 1-(3,5-difluoro-4-piridil)-7-metoxi-3-metil-8-[3-metil-1-(trideuteriometil)pirazol-4-il]imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (380 mg, 0,84 mmol, 98%), N-metil-2-pirrolidona (20 ml), carbonato de potasio (368 mg, 2,53 mmol, 95%) y CD<sub>3</sub>OD (2,45 ml, 53,9 mmol, 98%).

25 La mezcla se agitó durante 4 h a 100°C. Se agregaron 100 mL de agua y la solución resultante se extrajo 5 veces con 100 mL de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con 100 ml de salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se concentraron a sequedad y se purificaron mediante cromatografía en columna con diclorometano/metanol (10:1) para producir 300 mg (74%) de 1-[3-fluoro-5-(trideuteriometoxi)-4-piridil]-7-metoxi-3-metil-8-[3-metil-1-(trideuteriometil)pirazol-4-il]imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido naranja. HPLC/MS (pureza) 95%. Rt 0,65 min (método D). [M+H]<sup>+</sup> 455. [M+H]<sup>+</sup> 455, RMN 1H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm = 8,87 (s, 1 H), 8,65 (d, J = 7,5 Hz, 2 H), 7,78 (s, 1 H), 7,49 (s, 1 H), 6,95 (s, 1 H), 3,89 (s, 3 H), 3,55 (s, 3 H), 1,71 (s, 3 H).

30 *Método A de HPLC:*

Columna: Shim-pack XR-ODS, 3,0 x 50 mm, 2,2 µm; fase móvil A: agua/TFA al 0,05%, fase móvil B: acetonitrilo/TFA al 0,05%; caudal: 1,0 ml/min; gradiente: 5% de B a 100% de B en 2,2 min, mantener 1,0 min; 254 nm.

*Método B de HPLC:*

35 Columna: Shim-pack XR-ODS, 3,0 x 50 mm, 2,2 µm; fase móvil A: agua/TFA al 0,05%, fase móvil B: acetonitrilo/TFA al 0,05%; caudal: 1,2 ml/min; gradiente: 5% de B a 100% de B en 2,0 min, mantener 0,7 min; 254 nm.

*Método C de HPLC:*

Columna: Poroshell HPH-C18, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm; fase móvil A: agua/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 5 mM, fase móvil B: acetonitrilo; caudal: 1,3 ml/min; gradiente: 10% de B a 95% de B en 2,1 min, mantener 0,6 min; 254 nm.

*Método D de HPLC:*

Columna: Ascentis Express C18, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm; fase móvil A: agua/TFA al 0,05%, fase móvil B: acetonitrilo/TFA al 0,05%; caudal: 1,5 ml/min; gradiente: 5% de B a 100% de B en 1,2 min, mantener 0,5 min; 254 nm.

**Ejemplo 7:** Formas sólidas y solvatos del Compuesto 15 **A. Preparación de la Forma A2 sólida**

La Forma A2 sólida del Compuesto 1 se preparó mediante diferentes procesos de cristalización por enfriamiento a partir de alcoholes:

7.1 El Compuesto 1 se disolvió en 1-propanol a una concentración de aprox. 50 mg/mL a 50°C con agitación. La solución transparente resultante se enfrió a -20°C a una velocidad de enfriamiento de 0,1°C/min., con un período de mantenimiento final de al menos 1 h a -20°C. La separación sólido-líquido se llevó a cabo mediante filtración sobre succión al vacío, y la muestra sólida filtrada se secó bajo purga dinámica de nitrógeno durante la noche.

7.2 El Compuesto 1 se disolvió en alcohol isobutílico a una concentración de aprox. 40 mg/ml a 50°C con agitación. La solución transparente resultante se enfrió a -20°C a una velocidad de enfriamiento de 0,1°C/min., con un período de mantenimiento final de al menos 1 h a -20°C. La separación sólido-líquido se llevó a cabo mediante filtración sobre succión al vacío y la muestra sólida filtrada se secó bajo purga dinámica de nitrógeno durante la noche.

7.3 La forma hidrato H2 del Compuesto 1 (cuya preparación se describe a continuación) se dispersó en 2-PrOH a un nivel de concentración del 12% (m/m; con respecto a la masa seca del Compuesto 1). La dispersión resultante se calentó a 80°C con agitación para obtener una solución transparente. Se ejecutó una rampa de enfriamiento inicial de 80 a 70°C a una velocidad de 0,5°C/min, con un tiempo de mantenimiento posterior a 70°C. A 70°C, se añadieron cristales de siembra de la Forma A2 anhidra (partículas trituradas <50 µm; aproximadamente 4,5% en relación con la cantidad en el reactor). Los cristales de siembra se predispersaron en aprox. 1 mL de 2-PrOH por 100 mg de semilla. Se aplicó un tiempo de espera de 10 min después de la siembra a 70°C. Se ejecutó una rampa de enfriamiento de 70°C a 5°C a 0,1°C/min, seguida de un tiempo de retención de 3 horas a la temperatura final (5°C). La separación sólido-líquido se llevó a cabo mediante filtración sobre succión al vacío, y la muestra sólida filtrada se secó bajo purga dinámica de nitrógeno a 70°C durante la noche.

En un método alternativo, la Forma A2 se preparó mediante la conversión en suspensión de una forma polimórfica diferente de la siguiente manera:

7.4 El material sólido, en particular una forma polimórfica diferente del Compuesto 1, lo más preferiblemente la Forma H2 hidratada (cuya preparación se describe a continuación), se dispersó en aprox. 5,2 vol.-eq. de acetato de etilo y se agitó a TA durante 21 h. El precipitado se filtró con succión y se secó durante al menos 72 h a 60°C al vacío.

**B. Preparación de la Forma A1 sólida**

La Forma A1 sólida del Compuesto 1 se preparó mediante los dos métodos siguientes:

7.5 Aprox. 50 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (mezcla racémica) se sometieron a separación quiral SFC, usando una columna Lux Cellulose-2, y una mezcla de solventes de CO<sub>2</sub>/2-Propanol + 0,5% DEA (75:25) a un caudal de 5 ml/min. La fracción obtenida se enjuagó con diclorometano y se concentró a una temperatura del baño de 30°C para obtener un sólido.

7.6 Aprox. 10 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona disuelto en 100 µL de diclorometano (DCM) se evaporaron a TA (TA: temperatura ambiente, aprox. 20-25°C) para obtener un polvo.

**C. Preparación de la Forma A3 sólida**

7.7 Aprox. 12 mg de material sólido de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, que representa una forma mórfica alternativa distinta de A3, lo más preferiblemente que representa la Forma A2, se dispersaron en aprox. 40 µL de THF y se agitó a TA (20-25°C) durante aprox. 4 semanas. El sólido obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente en condiciones ambientales para obtener un polvo.

D. Preparación de Forma NF9 sólida:

La Forma NF9 sólida del Compuesto 1 se preparó mediante los dos métodos siguientes:

7.8 Aprox. 100 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, disueltos en 2000 µL de diclorometano, se evaporaron rápidamente al vacío a TA (aproximadamente 20-25°C) para obtener un polvo.

5 7.9 Aprox. 20 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, disuelto en 1000 µl de acetona a 50°C, se añadieron con 1 eq. de ácido benzoico. La solución se enfrió a TA (aproximadamente 20-25°C). A continuación, la solución se sometió a cristalización por difusión de vapor a TA (aproximadamente 20-25°C) usando un depósito de n-pentano, y se difundió lentamente en la solución mediante difusión en fase gaseosa. Después de unos días cristalizó un sólido,  
10 que se separó por centrifugación y se secó suavemente bajo purga de nitrógeno para obtener un polvo.

E. Preparación de Forma H1 sólida en hidrato

La Forma H sólida del Compuesto 1 hidratado se obtuvo mediante los dos métodos siguientes:

15 7.10 Aprox. 12-13 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, que representa una forma mórfica alternativa distinta de H1, más preferiblemente la Forma A2, se dispersaron en aprox. 200 µL de metanol y se agitaron a TA (20-25°C) durante 5 días. El sólido obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente en condiciones ambientales para obtener un polvo.

20 7.11 Aprox. 12 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, disueltos en 750 µl de 1-propanol, se evaporaron a TA (aproximadamente 20-25°C) para obtener un polvo.

F. Preparación de la Forma H2 sólida en hidrato

25 7.12 Aprox. 19 g de material sólido de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, que representa una forma mórfica alternativa distinta de H2, lo más preferiblemente que representa la Forma A2, se dispersaron en aprox. 80 ml de agua desionizada y se agitaron a TA (20-25°C) durante aprox. 4 días. El sólido obtenido se separó mediante filtración al vacío y se secó a 50°C bajo una purga de nitrógeno para obtener un polvo.

30 7.13 Aprox. 13-14 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, disueltos en 250 µL de THF, se vertieron rápidamente en un depósito de 1500 µL de agua DI a TA (aprox. 20-25°C) bajo agitación turbulenta. El precipitado obtenido se separó por centrifugación y se secó suavemente a condiciones ambientales para obtener un polvo.

G. Preparación de Forma NF19 sólida

7.14 Aprox. 48 mg de 8-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-1-(Sa)-(3-fluoro-5-metoxi-piridin-4-il)-7-metoxi-3-metil-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, disueltos en 1500 µL de metanol, se evaporaron a 50°C para obtener un polvo.

35 **Ejemplo 8:** Combinación con radioterapia

En un estudio de farmacología *in vivo* (modelo de tumor FaDu SSCHN), el tratamiento combinado del Compuesto 1 concomitante y la irradiación fraccionada durante 6 semanas (6 x 5 días, 2 Gy por fracción), mejoró fuertemente la eficacia de la IR (irradiación) en una dosis- de manera dependiente de acuerdo con el nivel de participación del objetivo, tal como se muestra en la figura 20. En detalle:

40 La eficacia antitumoral del compuesto inhibidor de ATM 1 se evaluó en combinación con irradiación (IR) en ratones NMRI nu/nu que llevaban xenoinjertos del modelo FaDu de cabeza y cuello de células escamosas humanas.

Uno de los grupos de control se trató solo con vehículo. El otro grupo de control se trató con IR solo a 30 fracciones de IR de 2 Gy en un programa de 5 días encendido/2 días fuera y durante un período de 6 semanas. Se trataron dos grupos con la combinación de IR (tal como en el control de IR solo) y el Compuesto 1 con una dosis oral de  
45 10 mg/kg, o 25 mg/kg 30 min antes de cada fracción de IR.

Ejemplo 9: Combinación con inhibición de PARP

La eficacia del Compuesto 1 en combinación con olaparib se demostró en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo derivado del paciente HBCx-10, desarrollado en ratones hembra inmunodeficientes, cuyos resultados se muestran en la figura 21.

5 Setenta (70) ratones con un tumor HBCx-10 de crecimiento subcutáneo (P20.1.4/0) entre 62,5 y 196,0 mm<sup>3</sup> se asignaron al tratamiento cuando su volumen tumoral medio y mediano alcanzaron 131,16 y 126,00 mm<sup>3</sup> respectivamente.

El estudio comprendió varios grupos de 10 ratones cada uno:

- En el grupo 1, el vehículo olaparib se administró a 10 ml/kg p.o. qd x 28 combinado con vehículo metocel administrado a 10 ml/kg p.o. (3d sí/4d no) x4;

10 - En el grupo 2, olaparib se dosificó a 50 mg/kg p.o. qd x 49;

- En el grupo 3, el inhibidor de ATM comparativo ATMix solo se administró p.o. (3d sí/4d no) x5;

- En el grupo 4, olaparib se dosificó a 50 mg/kg p.o. qd x 49 combinado con ATMix p.o. (3d sí/4d no) x 7;

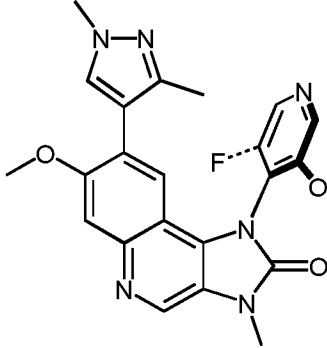
- En el grupo 5, olaparib se dosificó a 50 mg/kg p.o. qd x 49 combinado con el Compuesto 1 a 100 mg/kg p.o. (3d sí/4d no) x 7.

15 Los tumores se midieron cada dos semanas durante el período de tratamiento y una vez a la semana durante el período de seguimiento.

p.o. peroralmente - d día - qd *quaque die* - uno al día

REIVINDICACIONES

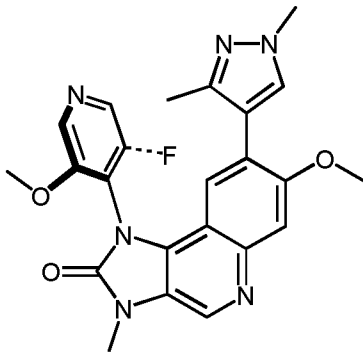
1. Un compuesto, representado por la siguiente fórmula



Compuesto 1

5 que puede incluir uno o más átomos isotópicamente enriquecidos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto, representado por la siguiente fórmula



Compuesto 2

10 que puede incluir uno o más átomos isotópicamente enriquecidos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

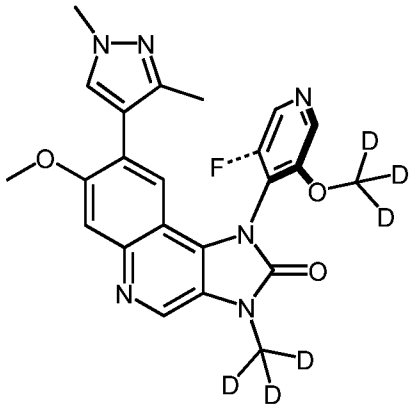
3. Una forma anhidra sólida del compuesto 1 de acuerdo con la reivindicación 1.

4. La forma anhidra sólida del Compuesto 1 de acuerdo con la reivindicación 3, que se caracteriza por uno o más picos en un patrón de difracción de rayos X en polvo seleccionado de aquellos a aproximadamente 7,3, aproximadamente 9,6, alrededor de 11,1, aproximadamente 12,0, aproximadamente 12,7 y aproximadamente 16,2 grados 2-theta  $\pm$  0,2 grados 2-theta.

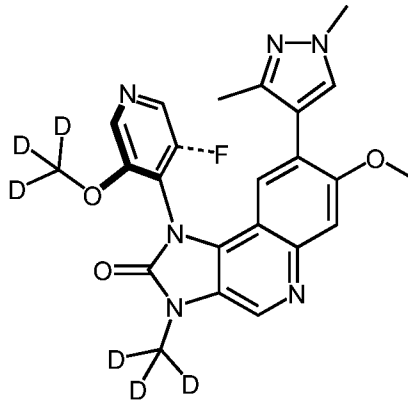
5. La forma anhidra sólida del Compuesto 1 de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que se caracteriza porque tiene un sistema cristalino monoclinico y un grupo espacial  $P2_1$  y/o los siguientes parámetros de su celda unitaria:

a	7,457 Å		$\alpha$	90,0°
b	15,982 Å		$\beta$	90,0°
c	18,246 Å		$\gamma$	90,0°
V	2174,5 Å <sup>3</sup>			

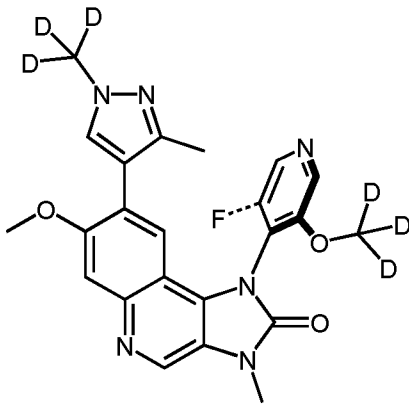
20 6. Un derivado deuterado de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, seleccionado de:



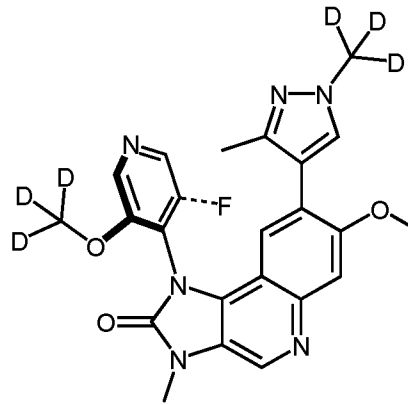
Compuesto 3-a



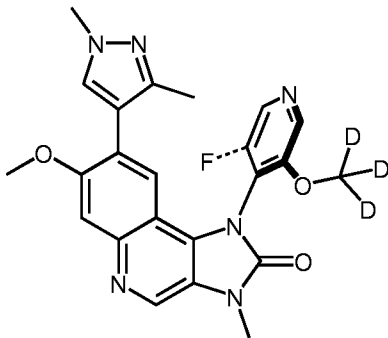
Compuesto 3-b



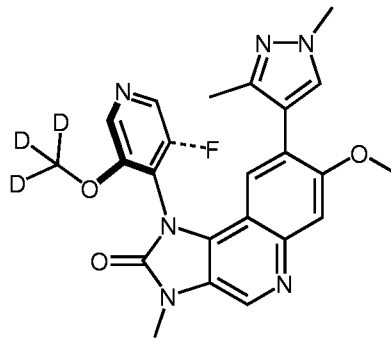
Compuesto 4-a



Compuesto 4-b



Compuesto 5-a



Compuesto 5-b

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida de éste de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de cáncer y/o tumores.

9. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo para uso en el tratamiento de cáncer y/o tumores de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tratamiento es en combinación con radioterapia.

10. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo para uso

en el tratamiento de cáncer y/o tumores de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el tratamiento es en combinación con un agente que daña el ADN.

5 11. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente que daña el ADN es un agente alquilante, un compuesto de platino, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), un inhibidor de ATR (*ataxia* telangiectasia y relacionados con RAD3), un agente modificador de ADN, un antibiótico anti-cáncer o un emisor alfa.

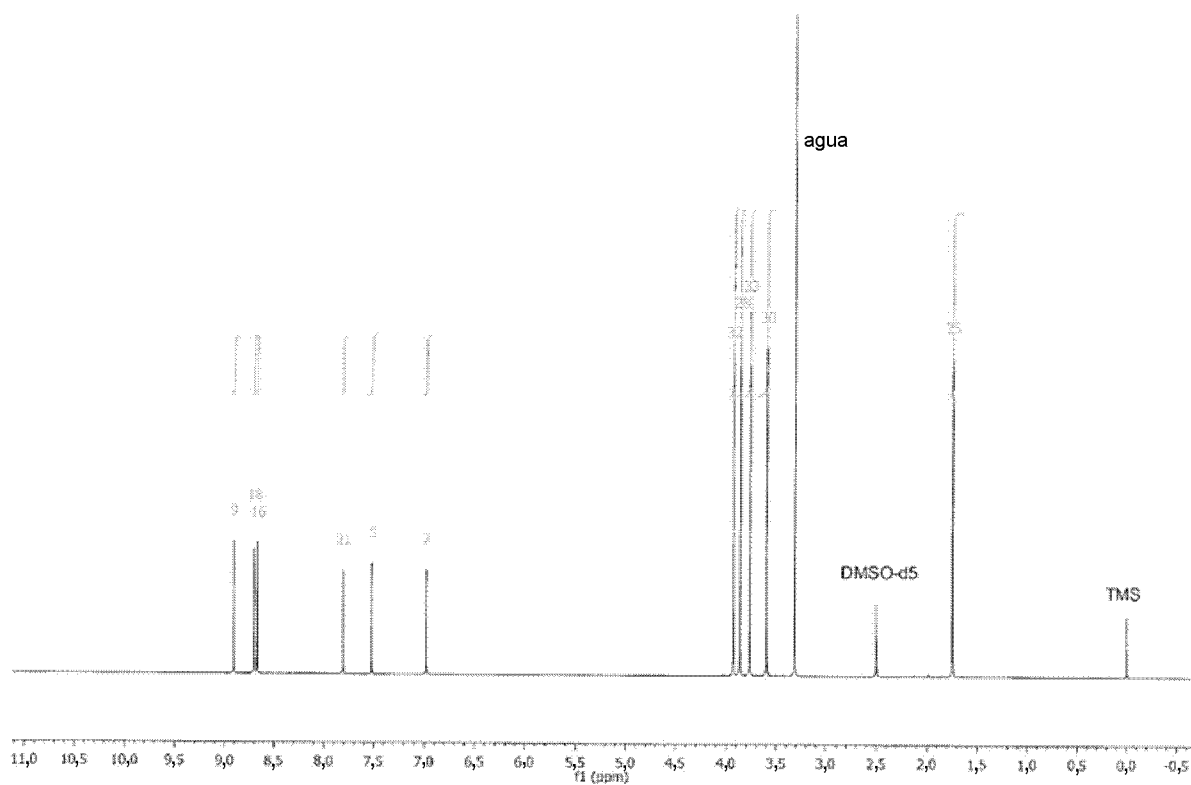
10 12. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo para uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el agente que daña el ADN se selecciona de  
 15 ifosfamida, bendamustina, busulfano, carmustina, cloroambucilo, clorometina, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, tosilato de improsulfán, lomustina, melfalán, mitobronitol, mitolactol, nimustina, ranimustina, temozolomida, tiotepa, treosulfán, mecloroetamina, carbocuoona, apazicuona, fotemustina, glufosfamida, palifosfamida, pipobromán, trofosfamida, uramustina, carboplatino, cisplatino, eptaplatino, hidrato de miriplatino, oxaliplatino, lobaplatino, nedaplatino, picoplatino, satraplatino, irinotecán, SN38, topotecán, camptotecina,  
 20 rubitecán, belotecán, etopósido, daunorrubicina, doxorubicina, aclarubicina, epirubicina, idarrubicina, amrubicina, pirarrubicina, valrubicina, zorrubicina, amsacrina, olaparib, niraparib, veliparib, 3-[3-(4-Metilaminometil-fenil)-isoxazol-5-il]-5-[4-(propano-2-sulfonyl)-fenil]-pirazin-2-ilamina), [5'-fluoro-4-(4-oxetan-3-il-piperazina-1-carbonil)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-[1,4']bipiridinil-3'-y l]-amida de ácido 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico, 4-[4-[1-[[S(R)]-S-metilsulfonimidoil]ciclopropil]-6-[(3R)-3-metil-4-morfolinil]-2-pirimidinil]-1H-pirrolol[2,3-b]piridina, 2-[(3R)-3-metilmorfolin-4-il]-4-(1-metil-1H-pirazol-5-il)-8-(1H-pirazol-5-il)-1,7-naftiridina, amrubicina, bisantreno, decitabina, mitoxantrona, procarbazona, trabectedina, clofarabina, amsacrina, brostallicina, pixantrona, laromustina, bleomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, levamisol, miltefosina, mitomicina C, romidepsina, estreptozocina, valrubicina, zinostatina, zorrubicina, daunurobicina, plicamicina, aclarubicina, peplomomicina, pirarrubicina, alfaradina (dicloruro de <sup>223</sup>Ra, Xofgio), <sup>211</sup>At, <sup>213</sup>Bi, <sup>225</sup>Ac y <sup>227</sup>Th.

25 13. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo para uso en el tratamiento de cáncer y/o tumores de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 12, en donde el tumor se selecciona del grupo de enfermedades del epitelio escamoso, vejiga, estómago, riñones, cabeza, cuello, esófago, cuello uterino, tiroides, intestino, hueso, hígado, cerebro, próstata, tracto urogenital, sistema linfático, laringe, pulmón, piel, sangre y sistema inmunitario, y/o en donde el cáncer se selecciona de leucemia monocítica, adenocarcinoma  
 30 de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma, carcinoma intestinal, carcinoma de mama, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfática aguda, leucemia linfática crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin.

35 14. Una combinación de un compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, derivado deuterado o forma anhidra sólida del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un agente que daña el ADN seleccionado de un agente alquilante, un compuesto de platino, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), un inhibidor de ATR (*ataxia* telangiectasia y relacionado con RAD3), un agente modificador de ADN, un antibiótico anti-cáncer y un emisor alfa para uso en el tratamiento de cáncer y/o tumores.

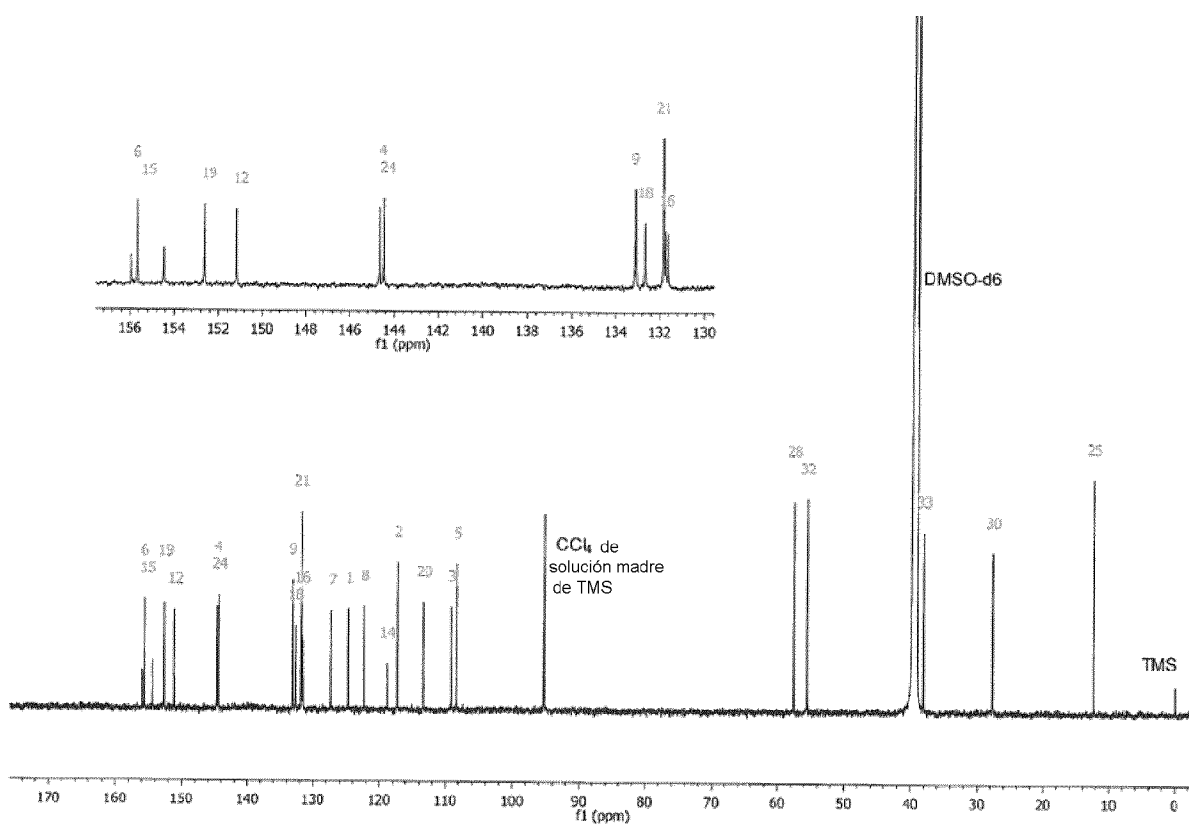
**FIGURA 1:**

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  anotado del compuesto 1  
(los números anotados denotan las asignaciones).**



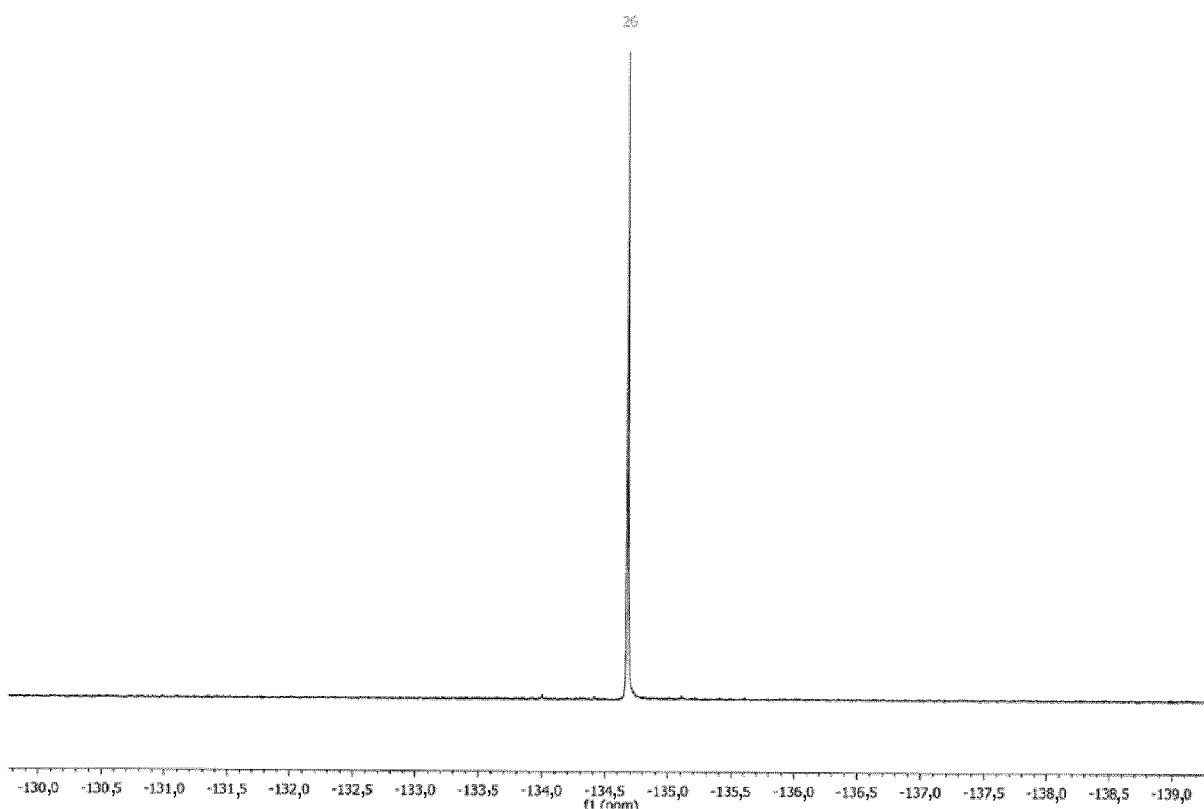
**FIGURA 2:**

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  anotado del compuesto 1  
(Los números anotados denotan las asignaciones).**



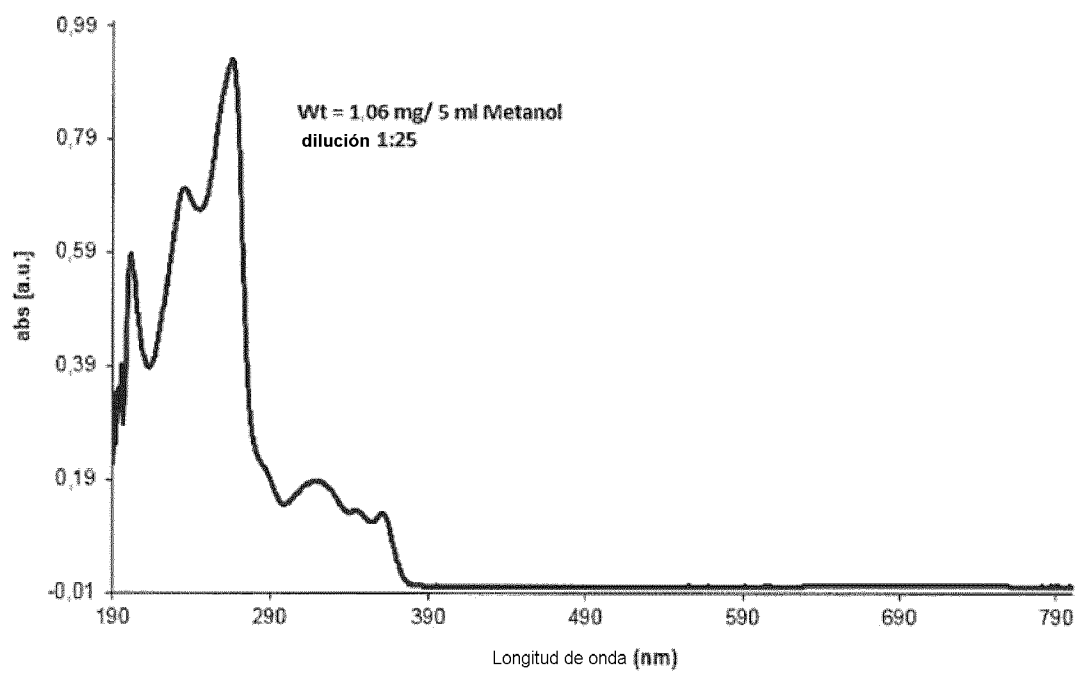
**FIGURA 3:**

**Espectro de RMN  $^{19}\text{F}$  anotado del compuesto 1 (los números anotados denotan las asignaciones).**



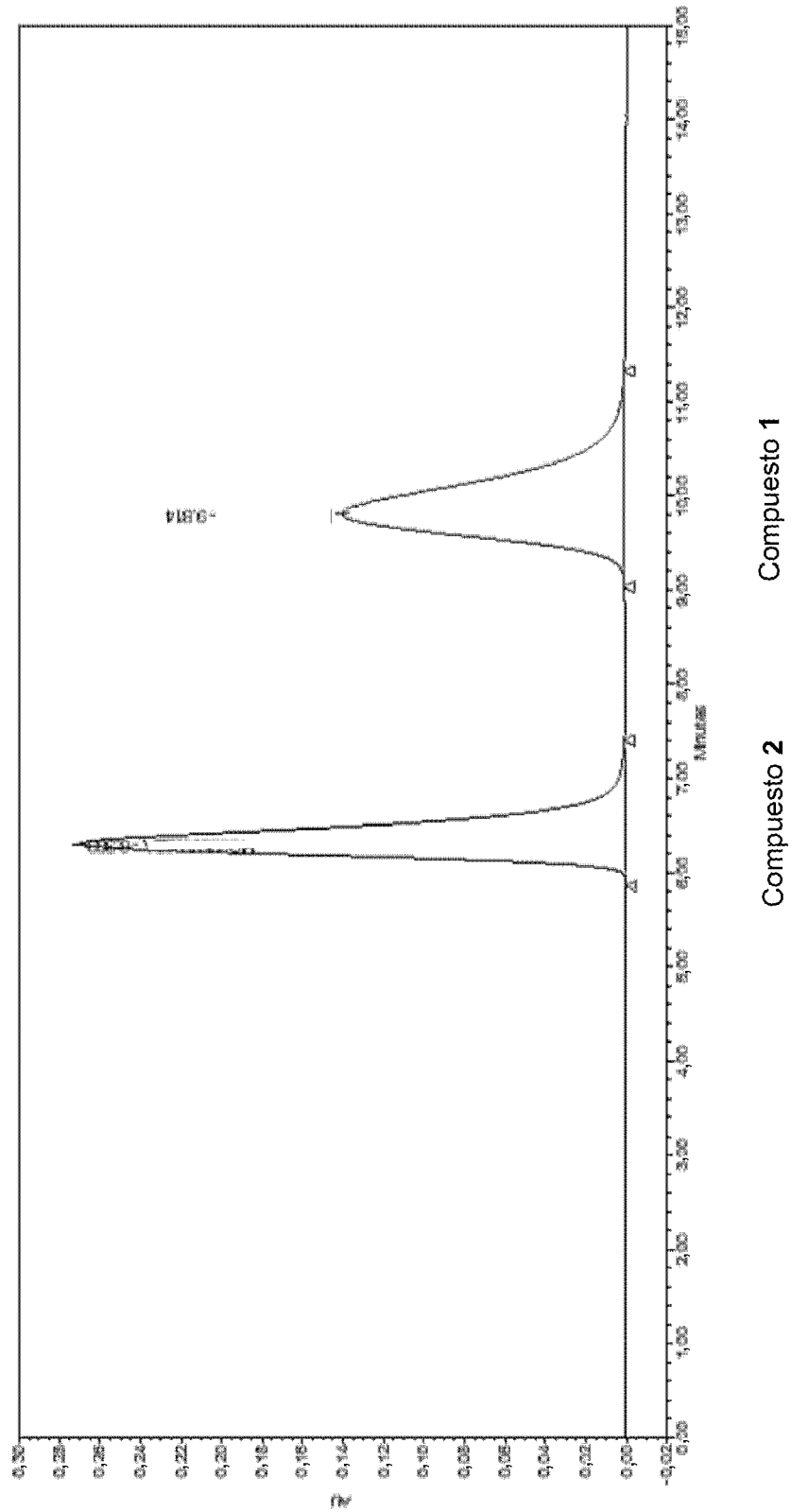
**FIGURA 4:**

**Espectro UV-Vis del compuesto 1 en metanol.**



**FIGURA 5:**

**Cromatograma de HPLC de los compuestos 1 y 2.**



**FIGURA6:**

**Diagrama de flujo de la preparación de compuestos 1 y 2.**

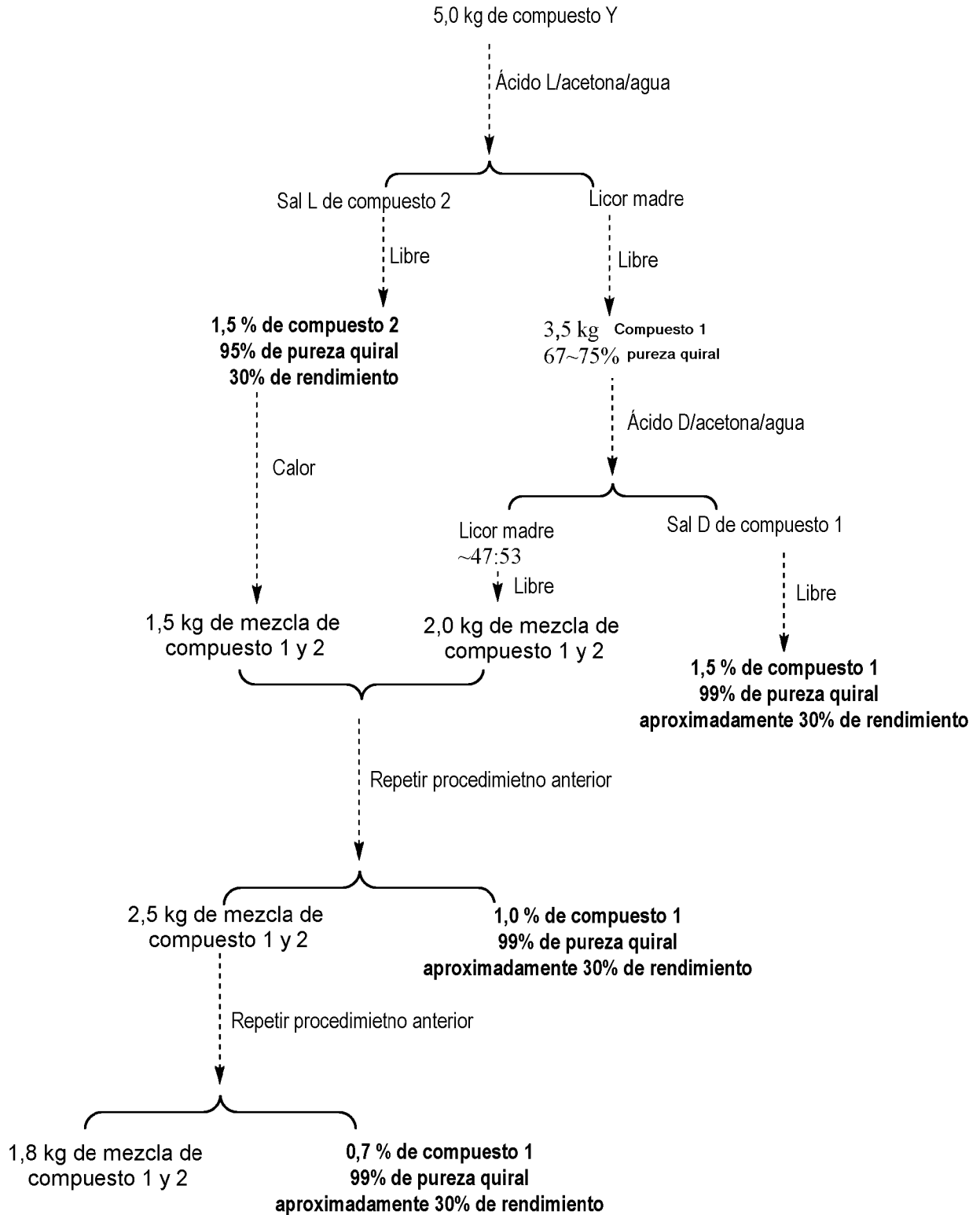
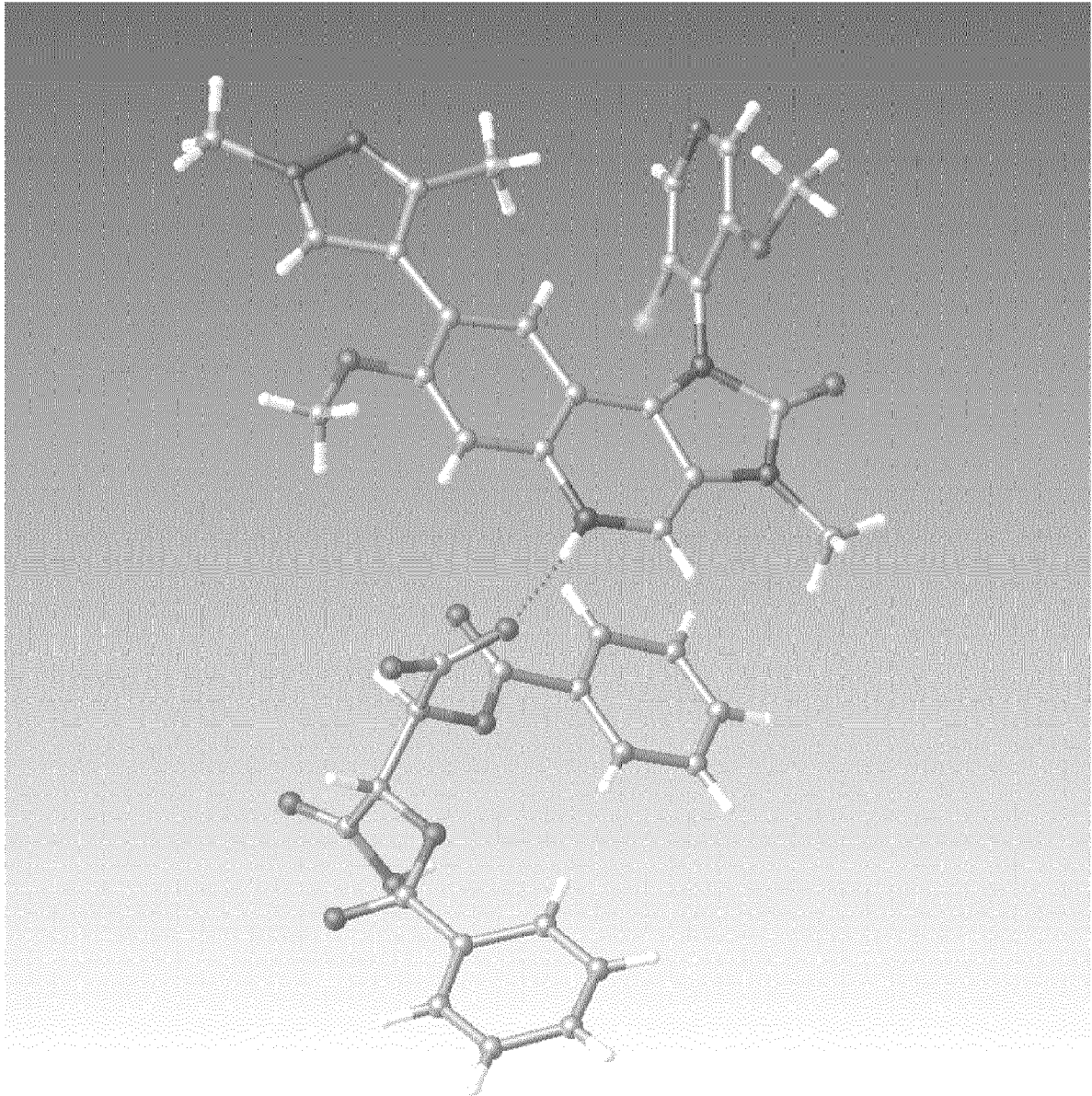


FIGURA 7:

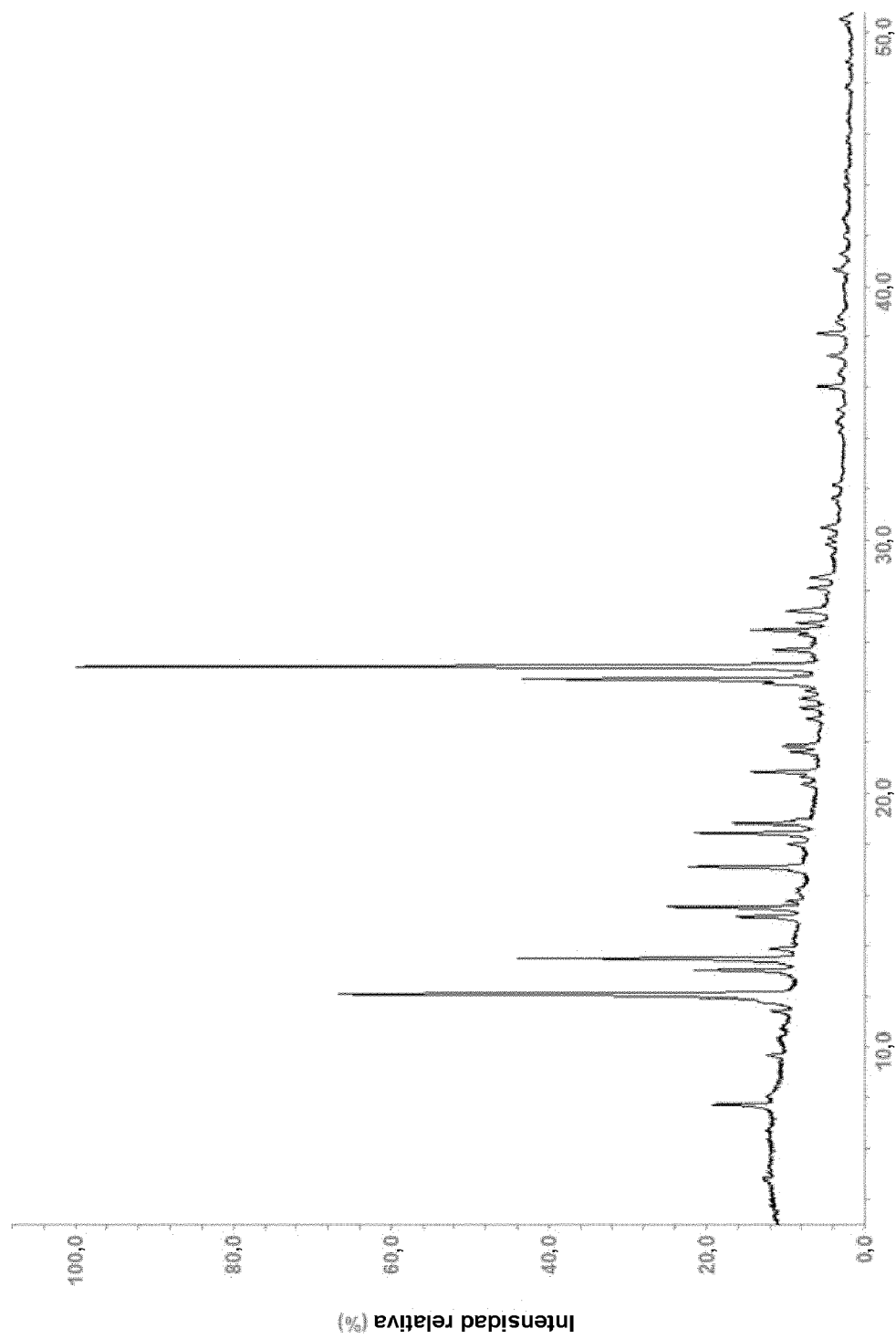
A: Estructura cristalina del compuesto-1-dibenzoil-D-tartrato.



La estructura absoluta se ha determinado con base en el (2S,3S)-Dibenzoil-D-tartrato. -

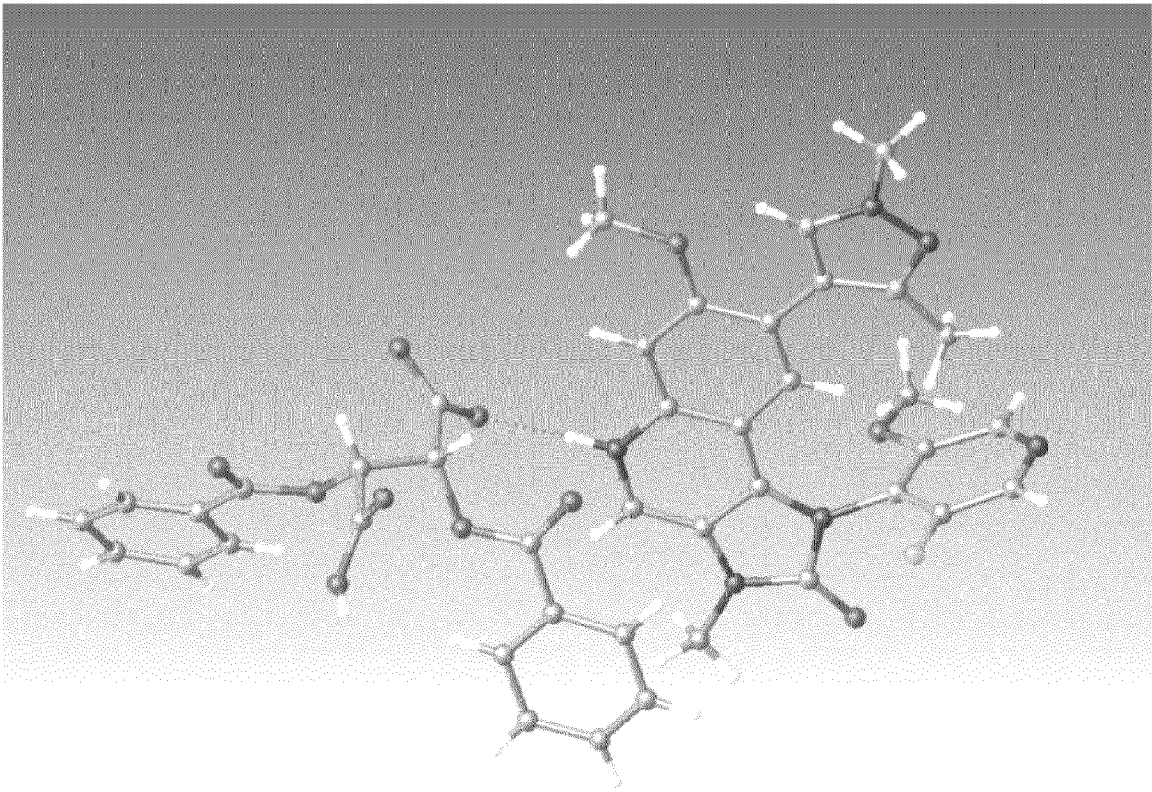
**FIGURA 7:**

**B: XRPD del compuesto-1-dibenzoil-D-tartrato.**



**FIGURA 8:**

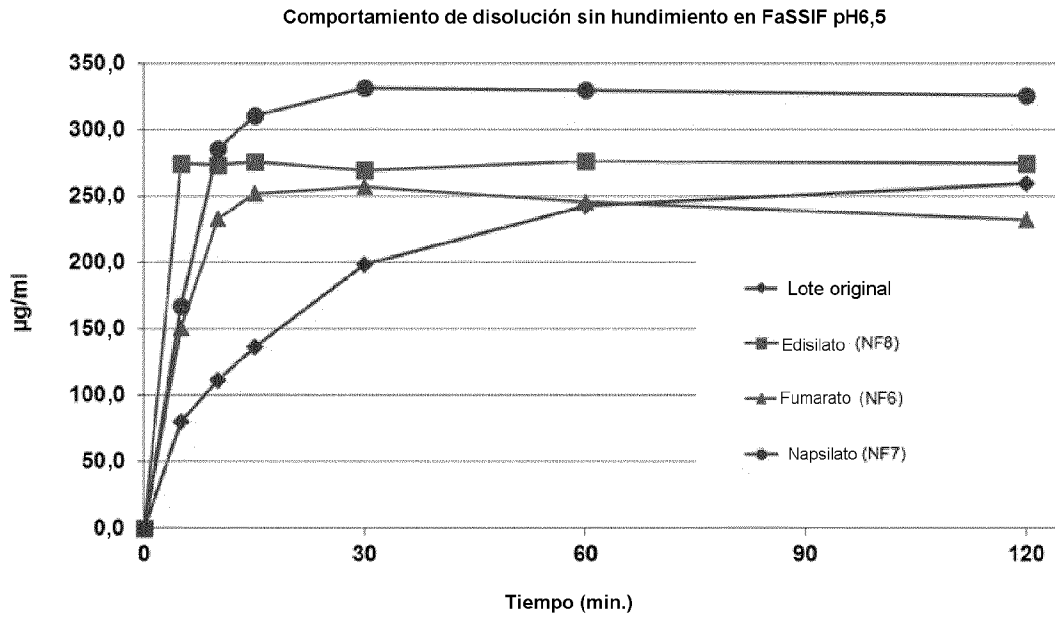
**Estructura cristalina del compuesto-2-dibenzoil-L-tartrato.**



La estructura absoluta se ha determinado con base en el (2R,3R)-Dibenzoil-L-tartrato.

**FIGURA 9:**

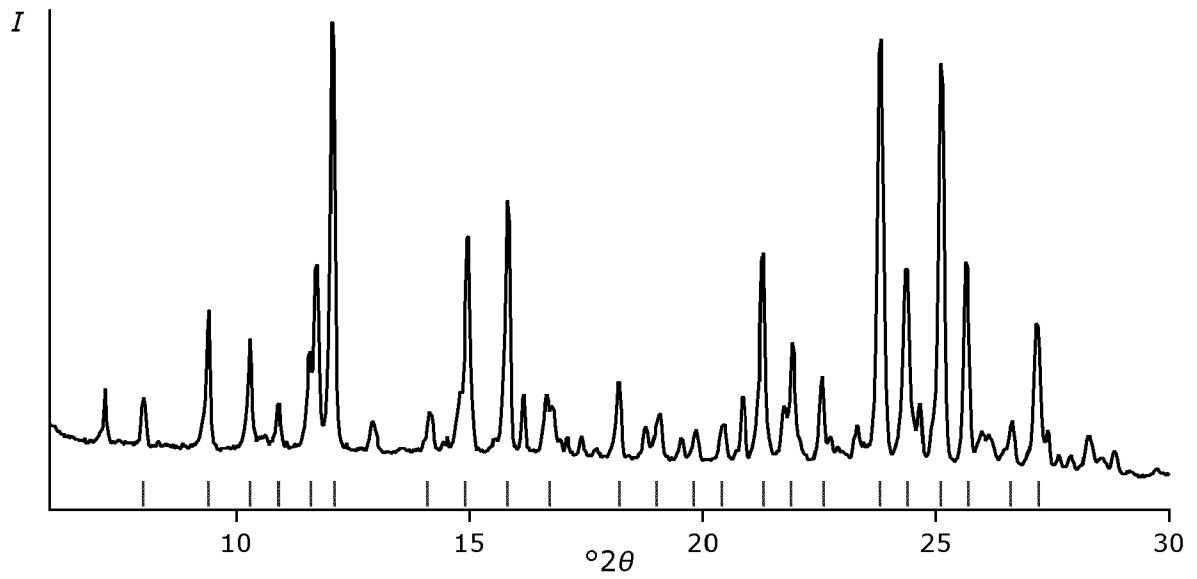
**Comportamiento de disolución sin hundimiento en FaSSIF del compuesto 1 y sales específicas de los mismos.**



Lote original = Compuesto 1

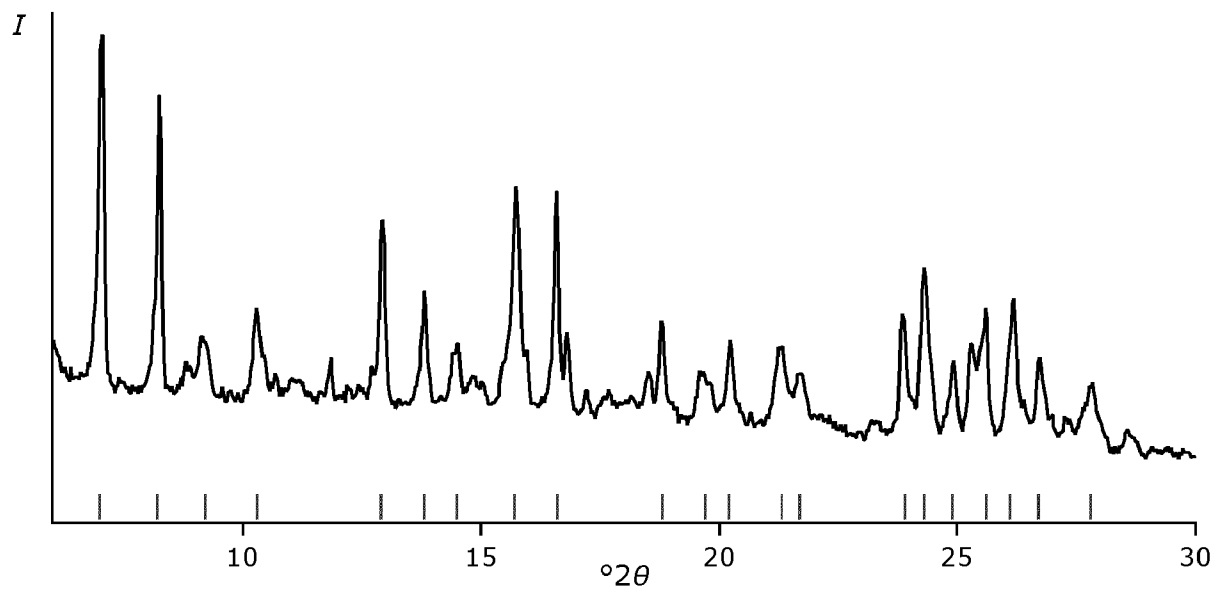
**FIGURA 10:**

**XRPD de la Forma Sólida de Fumarato de Compuesto 1**



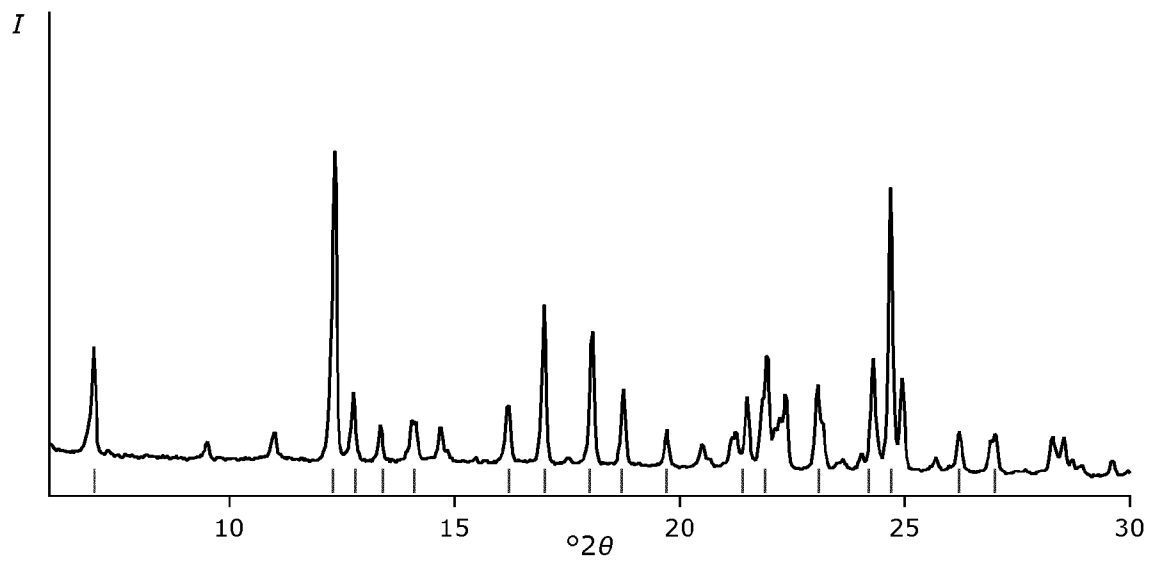
**FIGURA 11:**

**XRPD de la Forma Sólida de Napsilato de Compuesto 1**



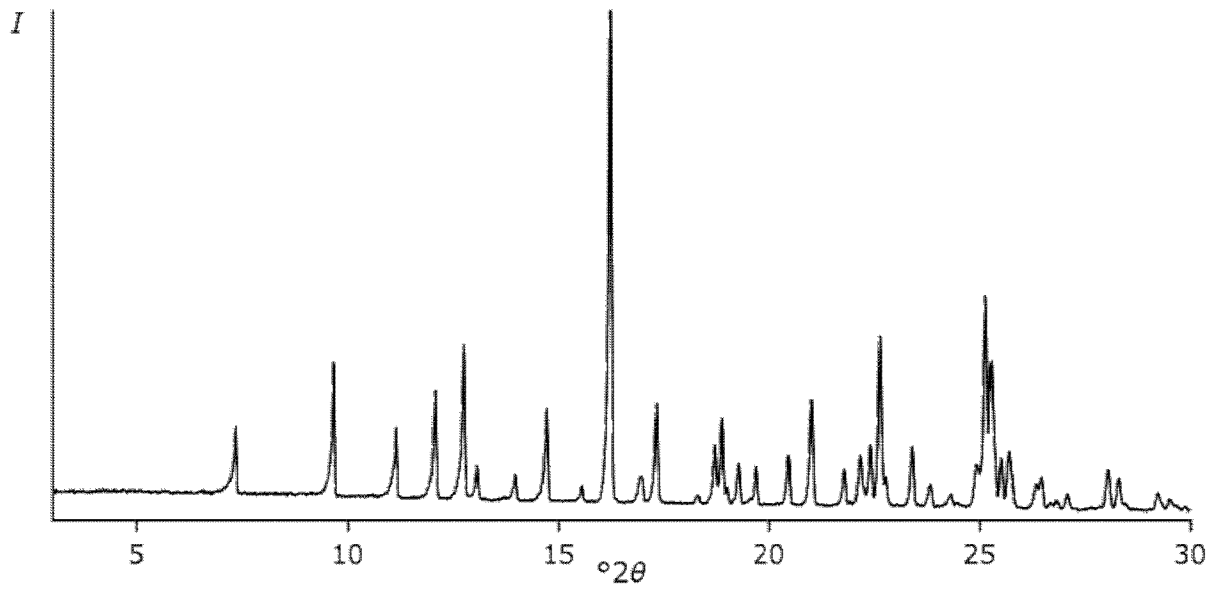
**FIGURA 12:**

**XRPD de la Forma Sólida de Edisilato de Compuesto 1.**



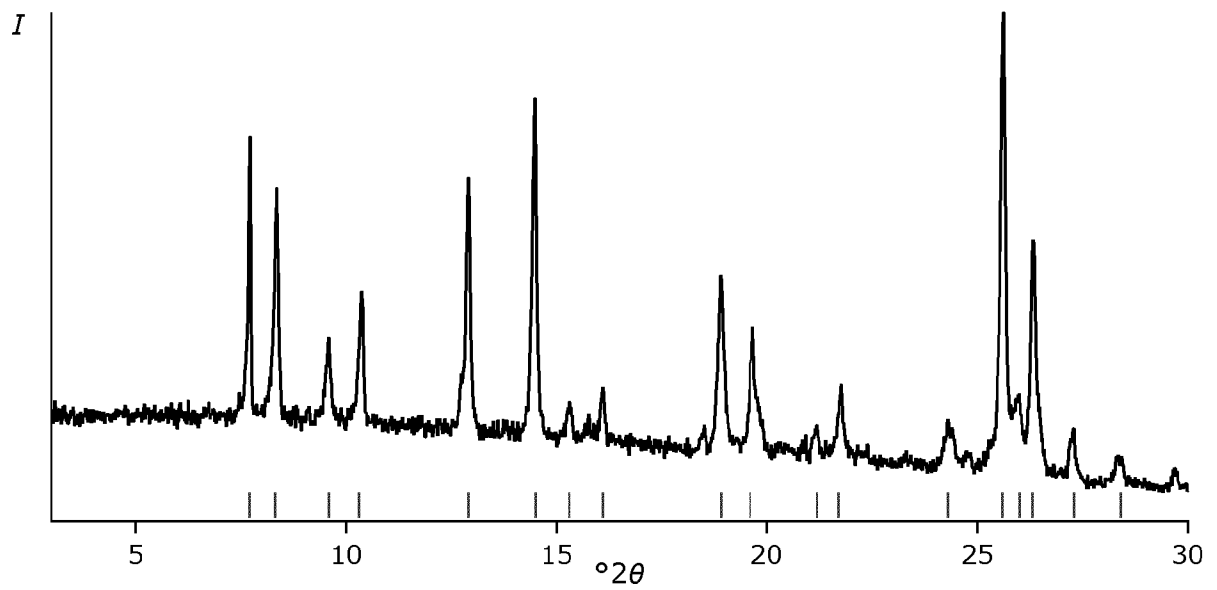
**FIGURA 13:**

**XRPD de la Forma Sólida A2 del Compuesto 1.**



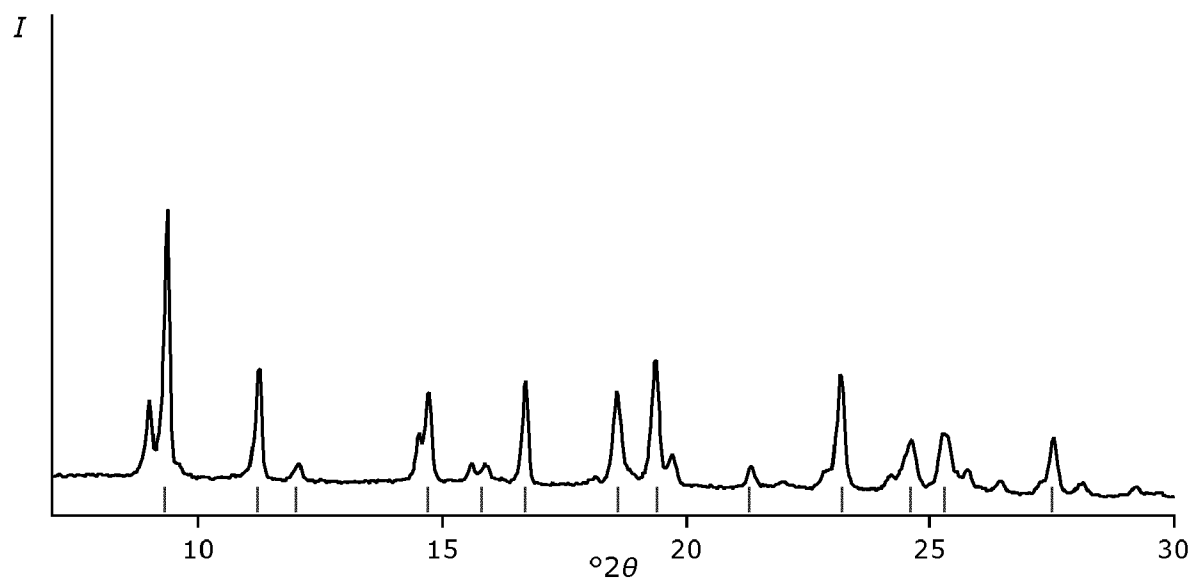
**FIGURA 14:**

**XRPD de la Forma Sólida A1 del Compuesto 1.**



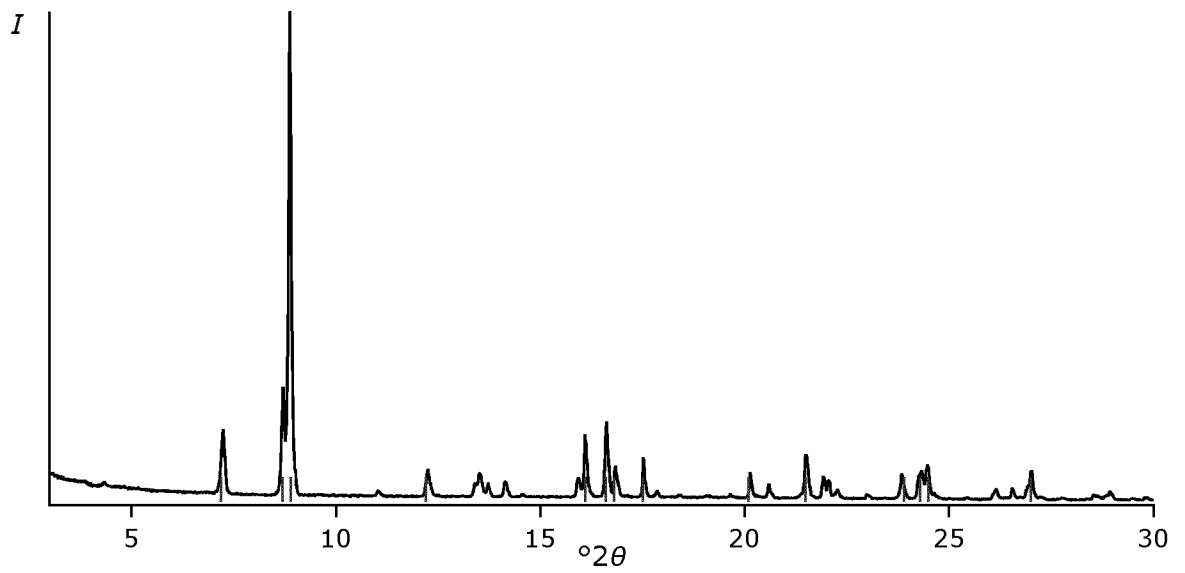
**FIGURA 15:**

**XRPD de la Forma Sólida A3 del Compuesto 1.**



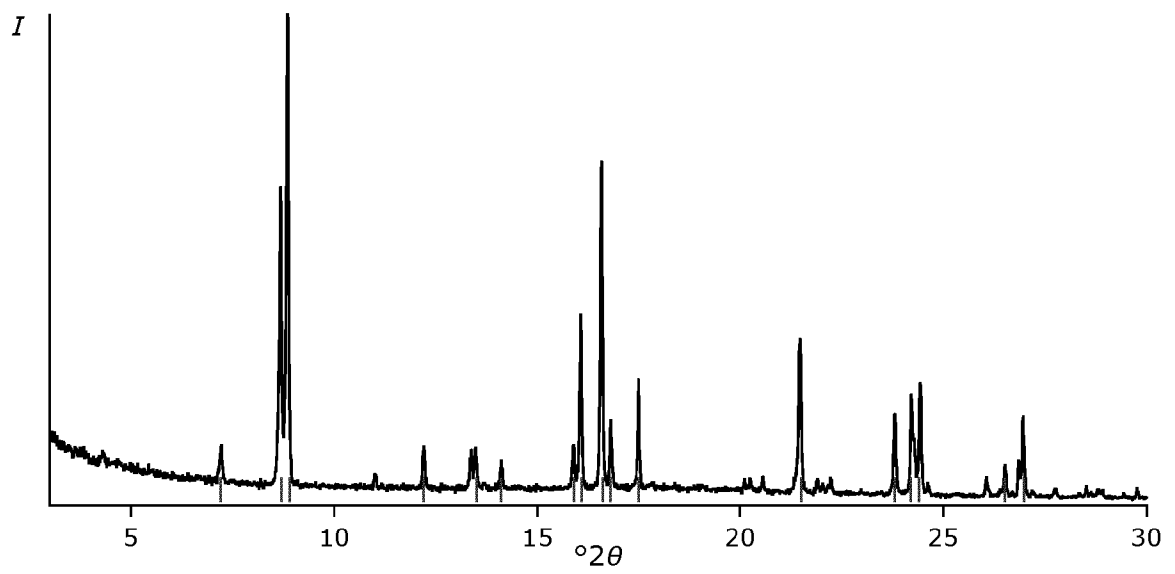
**FIGURA 16:**

**XRPD de la Forma Sólida NF9 del Compuesto 1.**



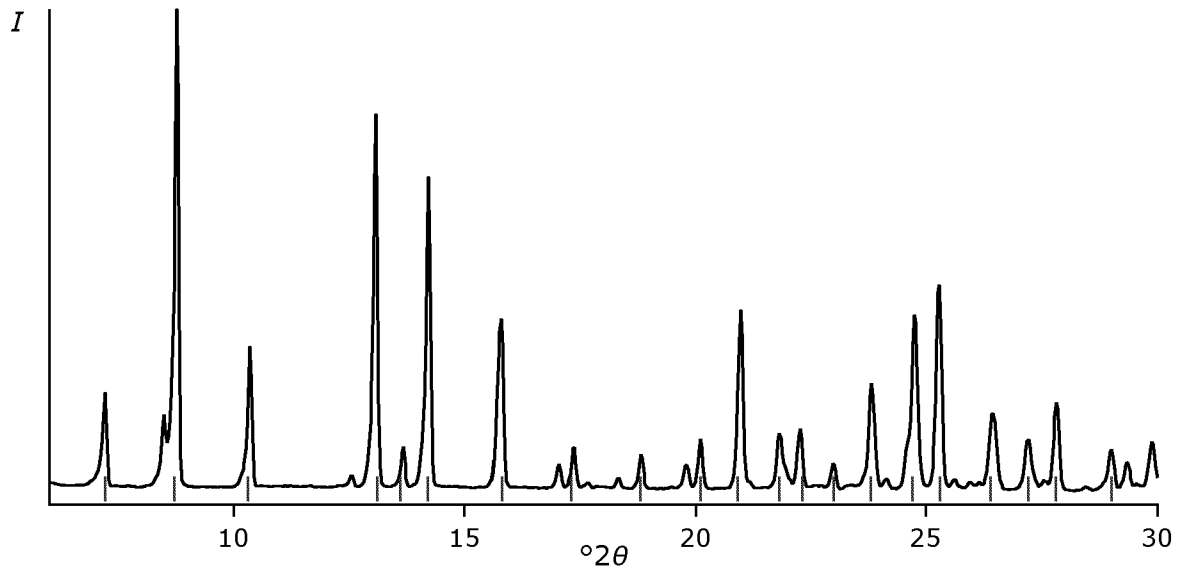
**FIGURA 17:**

**XRPD de la Forma Sólida H1 del Hidrato de Compuesto 1.**



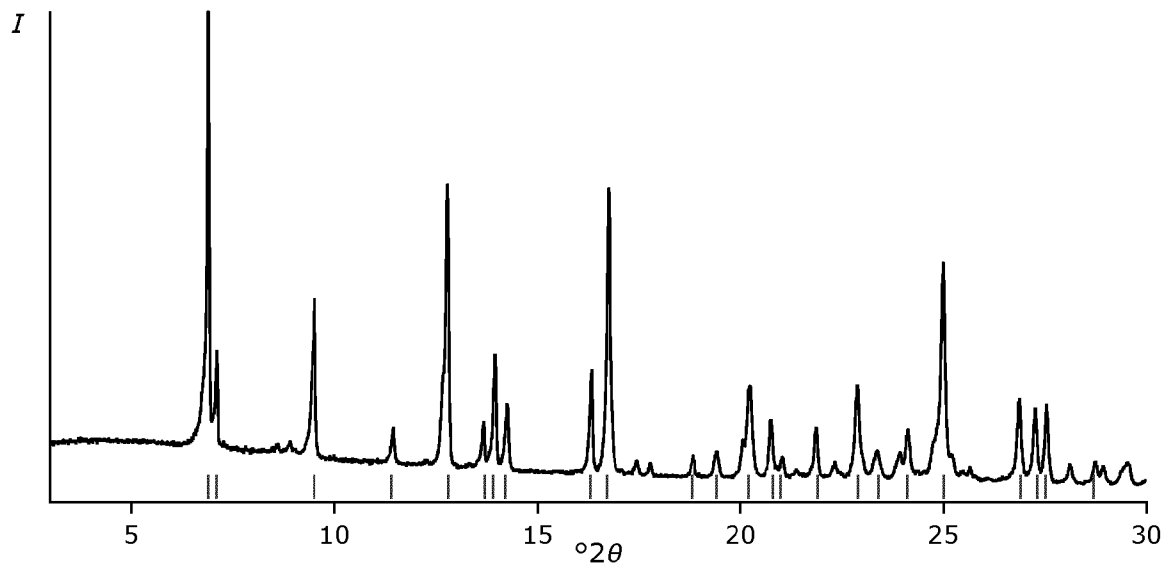
**FIGURA 18:**

**XRPD de la Forma Sólida H2 del Hidrato de Compuesto 1.**



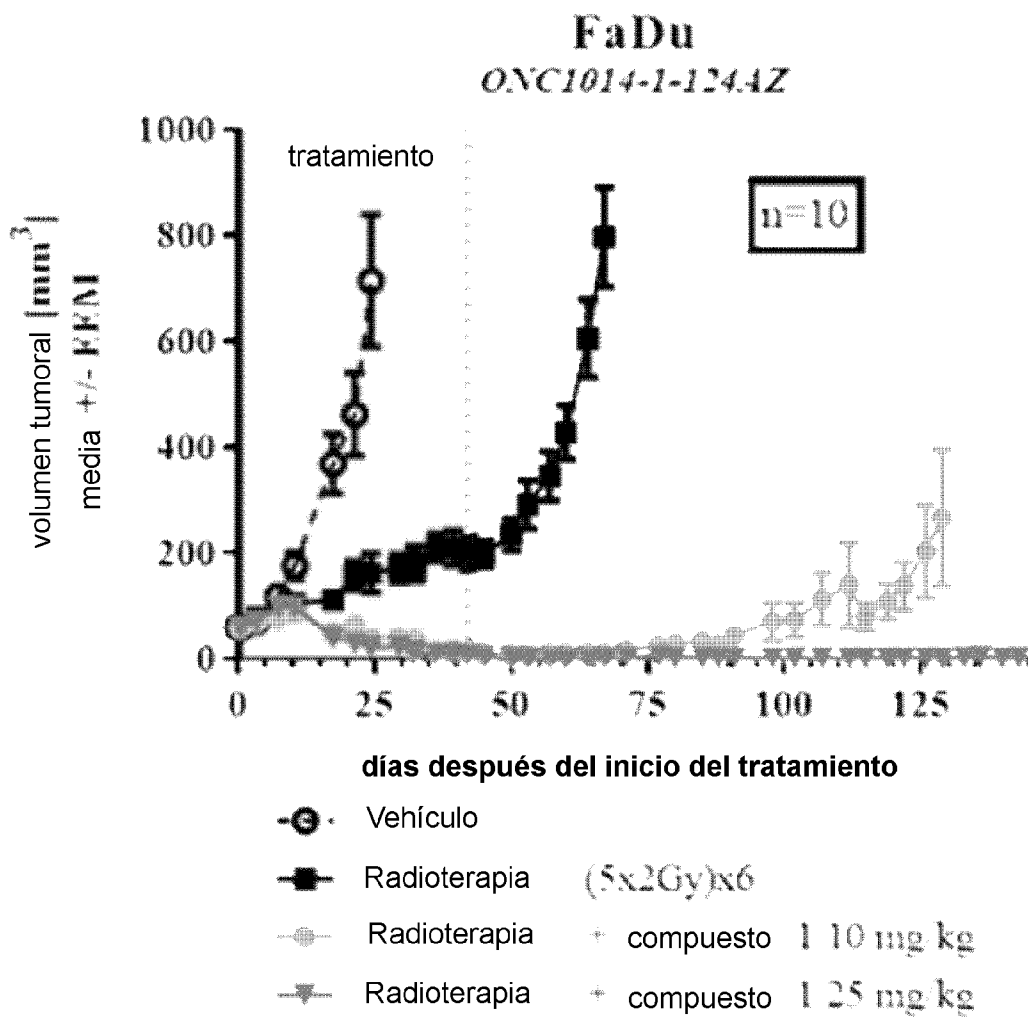
**FIGURA 19:**

**XRPD de la Forma Sólida NF19 del Compuesto 1.**



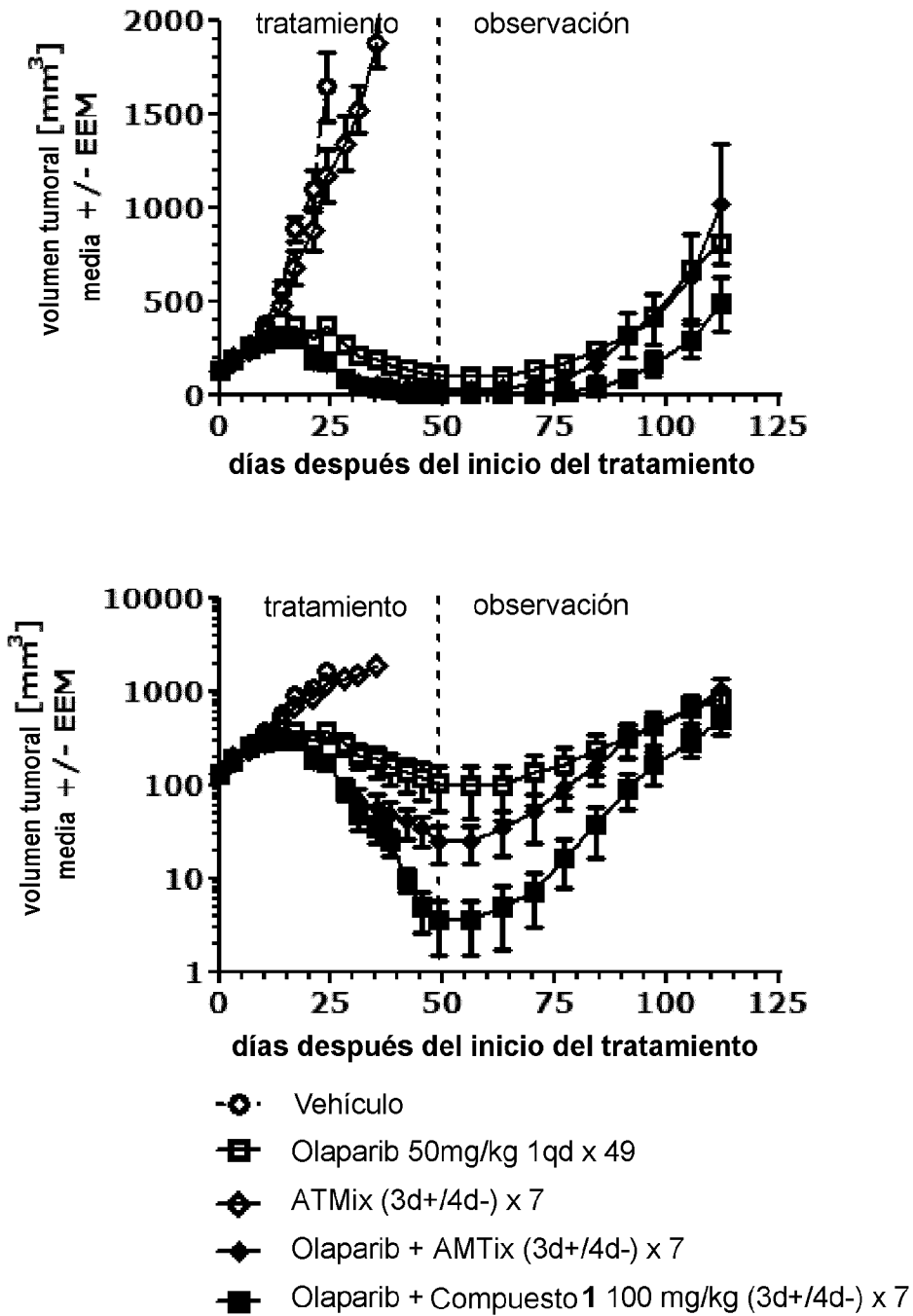
**FIGURA 20:**

**Inhibición fuerte del crecimiento tumoral por irradiación y compuesto oral concomitante 1 (6x5 días, 2 Gy; Modelo de tumor FaDu SCCHN)**



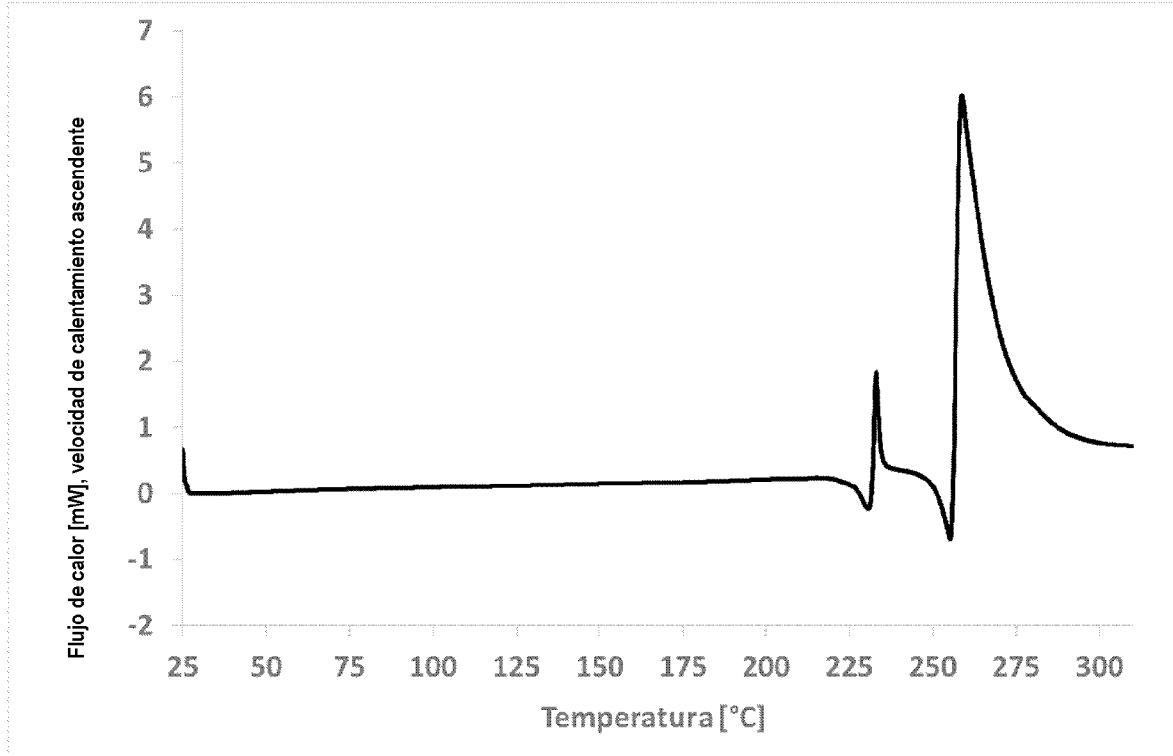
**FIGURA 21:**

**Evaluación *in vivo* de la actividad antitumoral del compuesto 1 y el inhibidor de ATM comparativo en combinación con olaparib, en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo derivado de paciente HBCx-10**



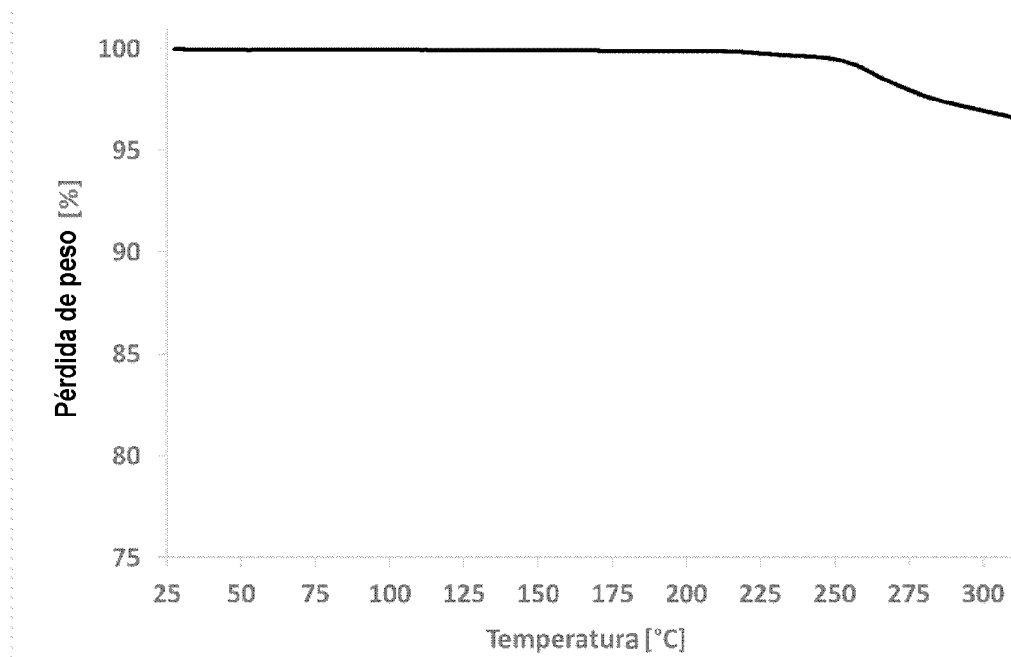
**FIGURA 22:**

**Curva de calentamiento por DSC de la Forma A2 del Compuesto 1**



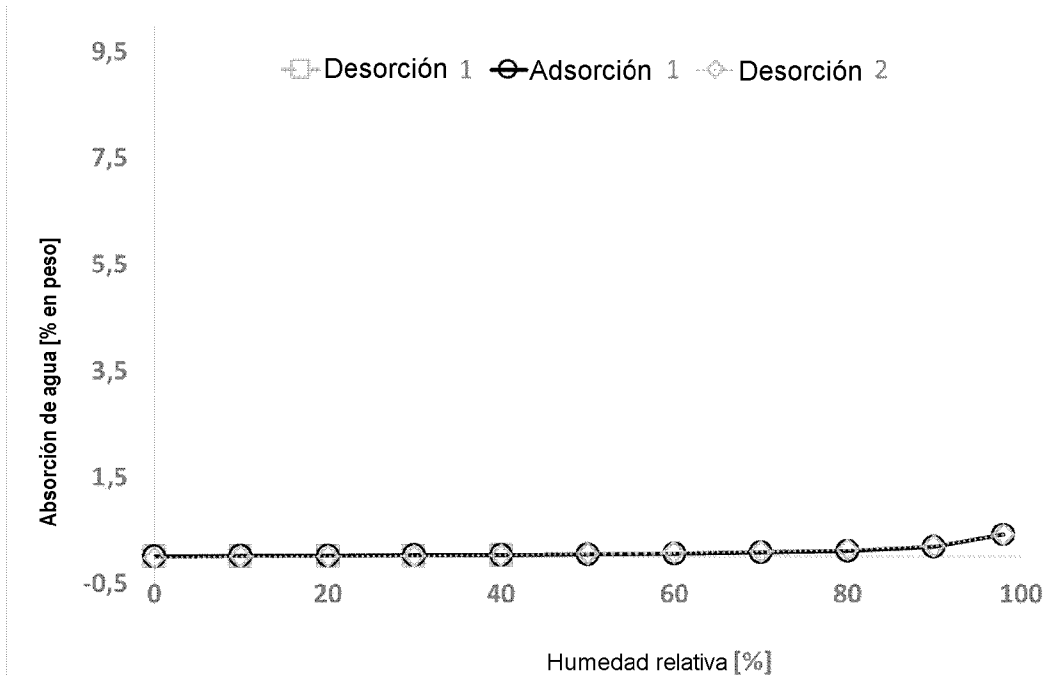
**FIGURA 23:**

**Curva de calentamiento por TGA de la Forma A2 del Compuesto 1**



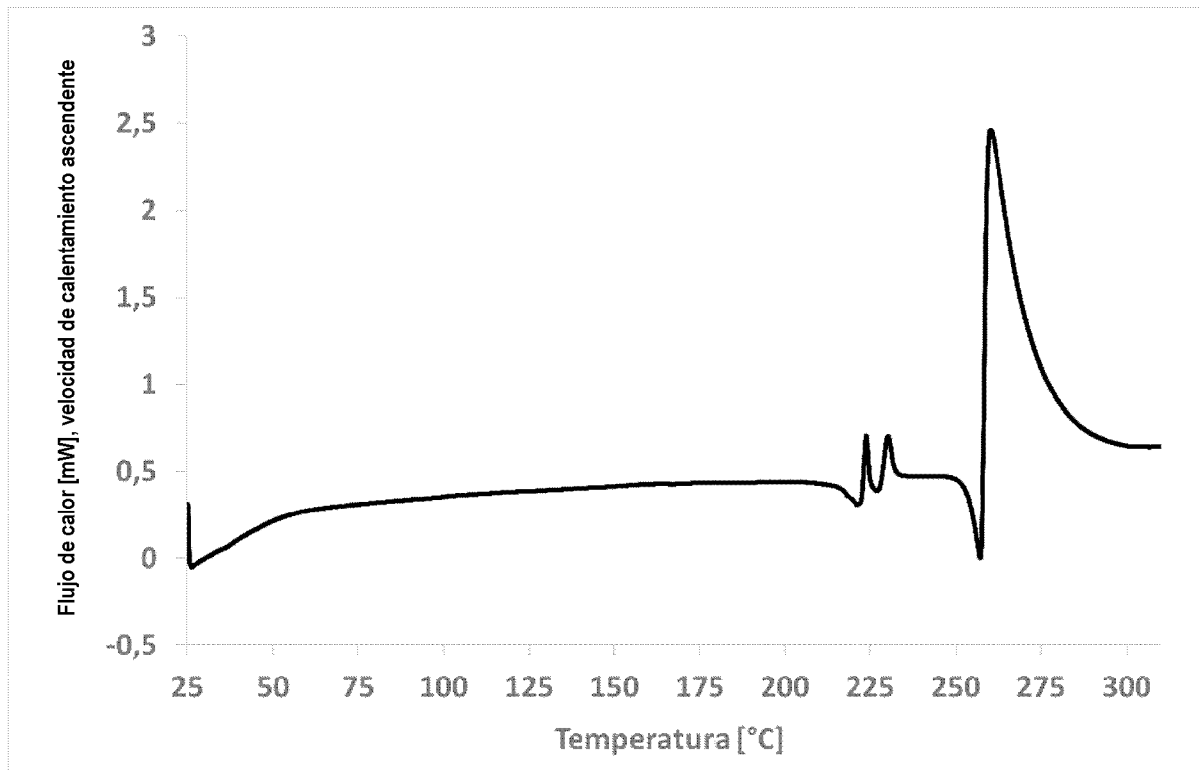
**FIGURA 24:**

**Isoterma de absorción de agua DVS (25 °C) de la Forma A2 del Compuesto 1**



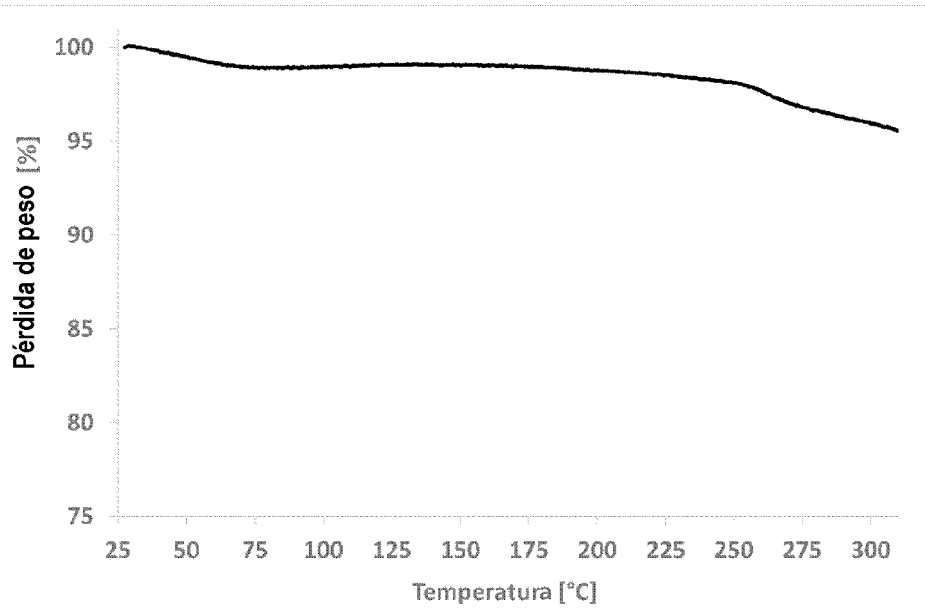
**FIGURA 25:**

**Curva de calentamiento por DSC de la Forma A1 del Compuesto 1**



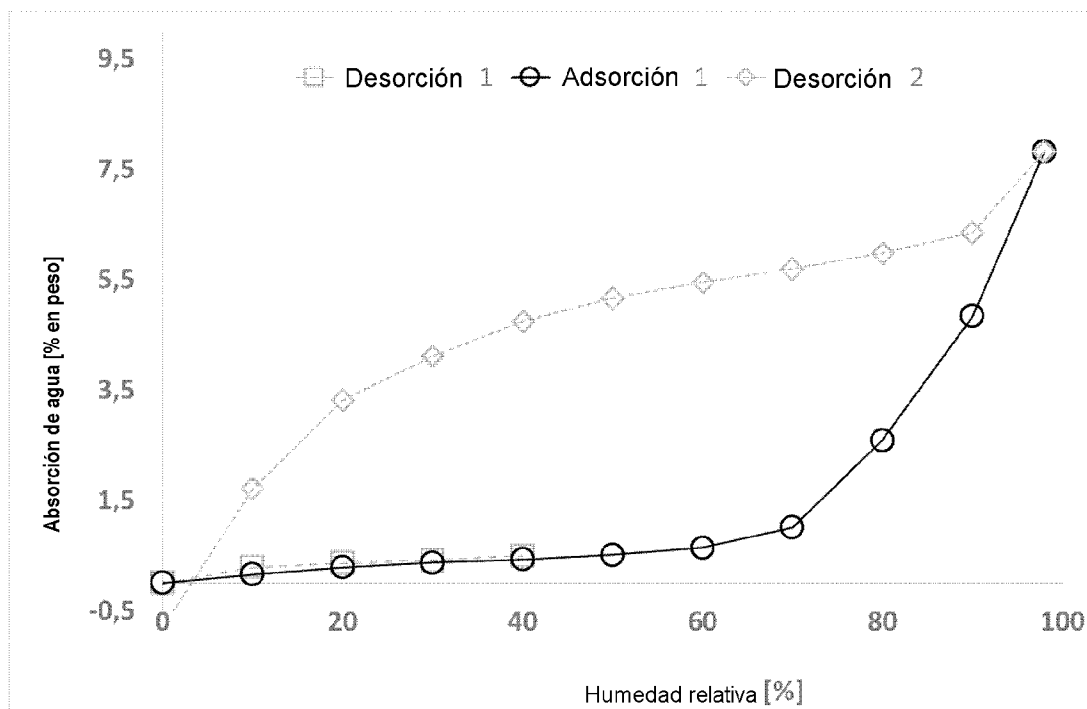
**FIGURA 26:**

**Curva de calentamiento por TGA de la Forma A1 del Compuesto 1**



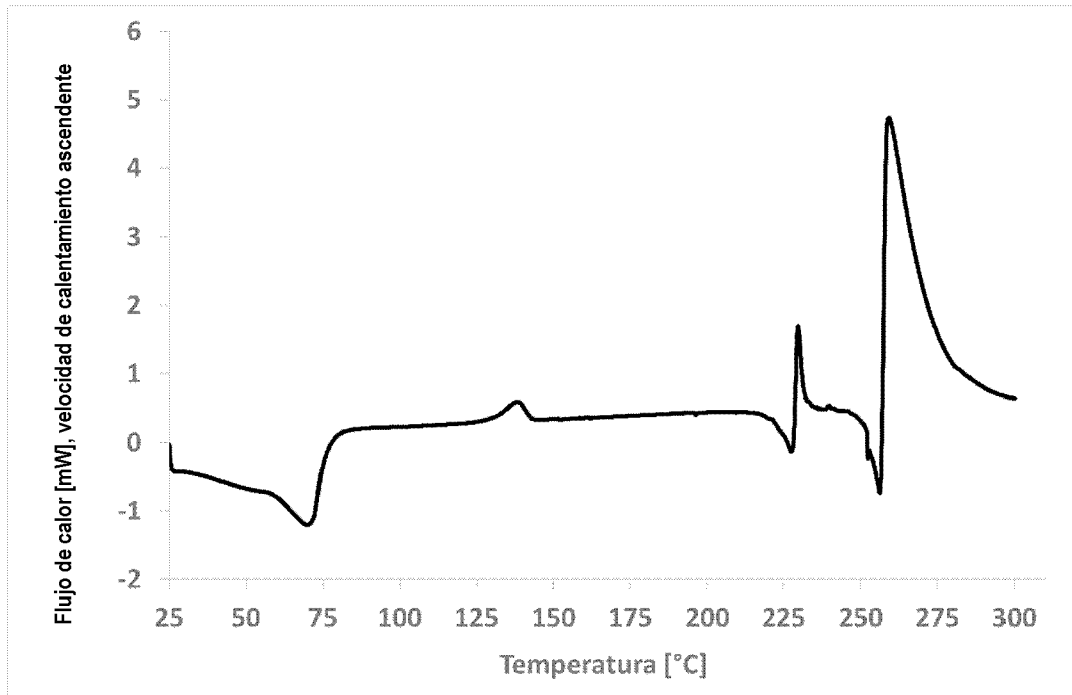
**FIGURA 27:**

**Isoterma de absorción de agua DVS (25 °C) de la Forma A3 del Compuesto 1**



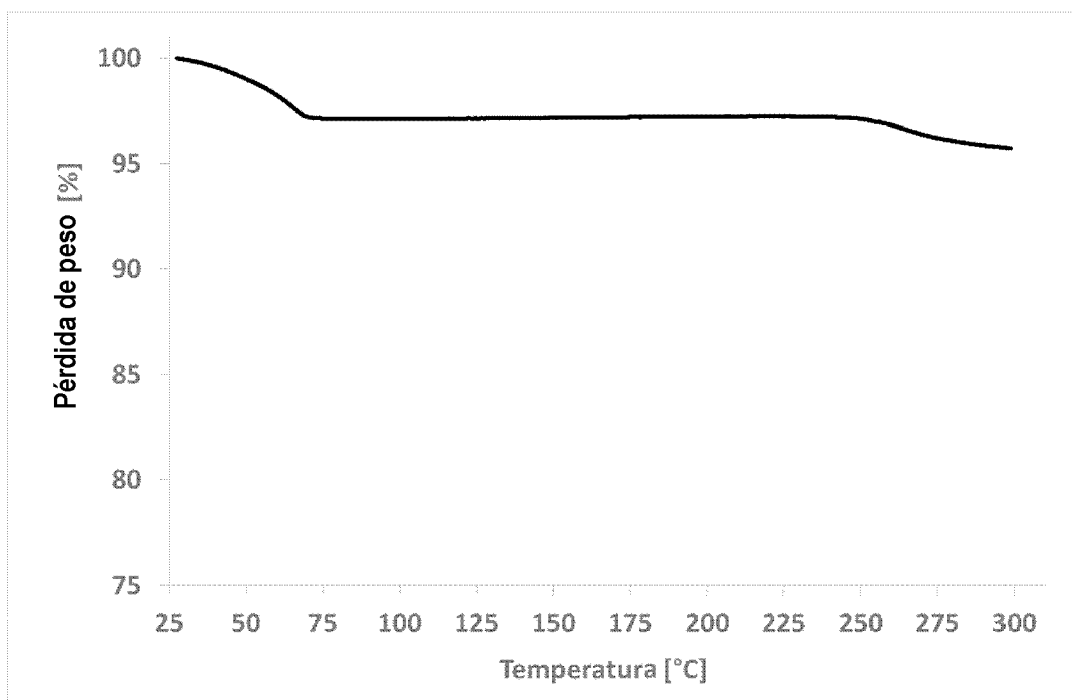
**FIGURA 28:**

Curva de calentamiento por DSC de la Forma H2 del Compuesto 1



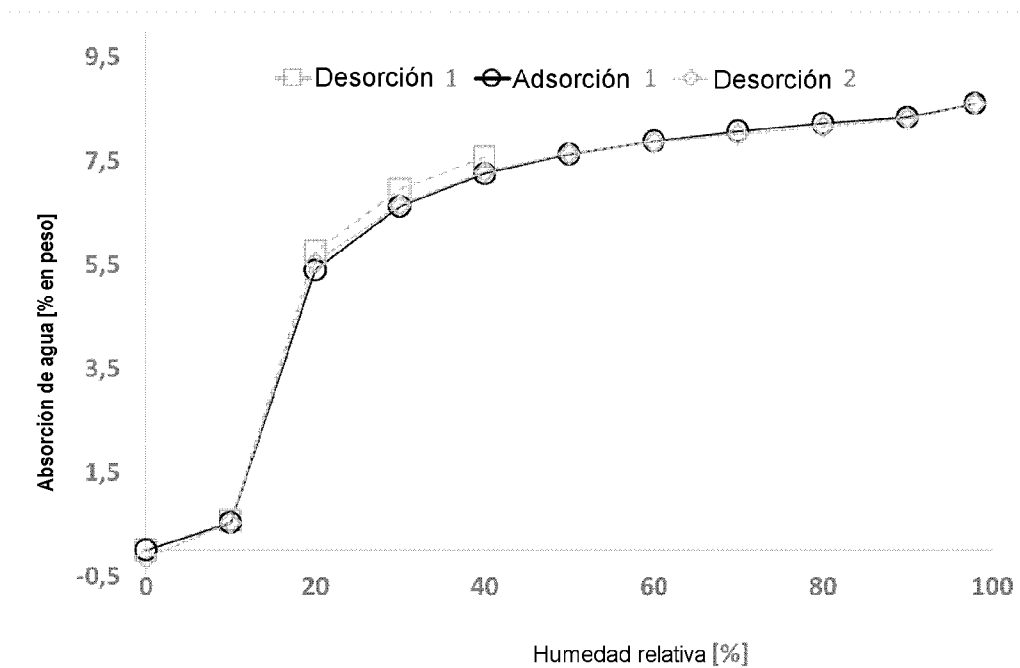
**FIGURA 29:**

Forma H2 de la curva de calentamiento por TGA del Compuesto 1



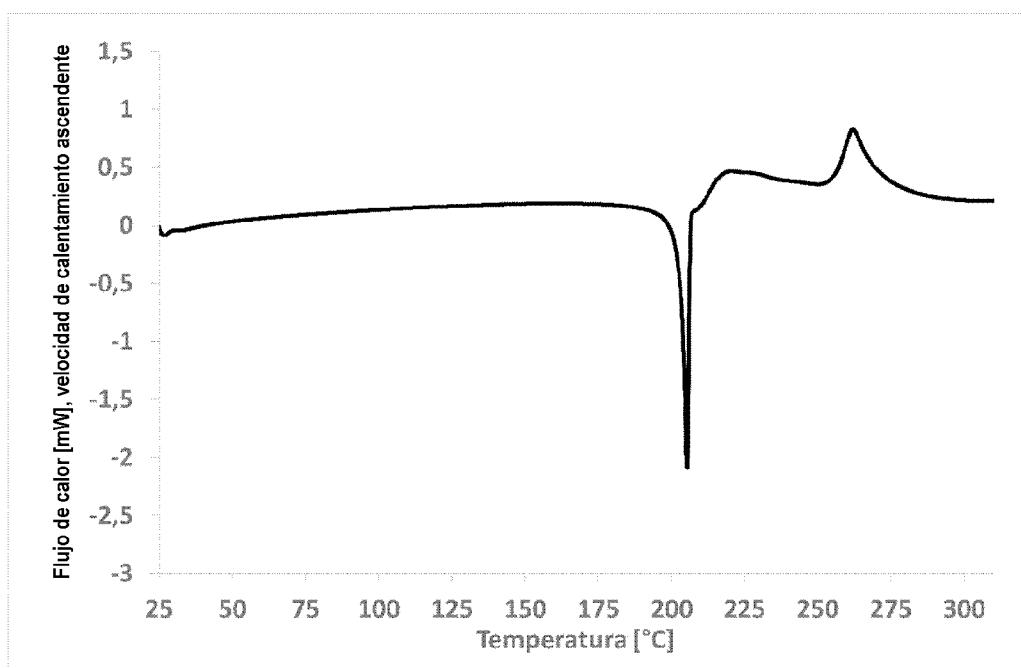
**FIGURA 30:**

Isoterma de absorción de agua DVS (25 °C) de la Forma H2 del Compuesto 1 (hidrato).



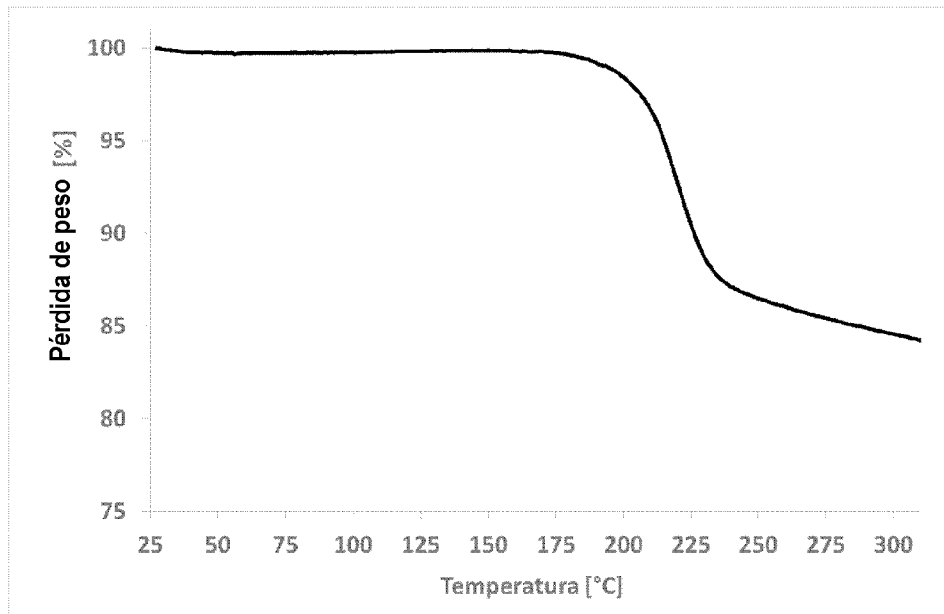
**FIGURA 31:**

Curva de calentamiento por DSC del Fumarato de Compuesto 1 (Forma "NF6")



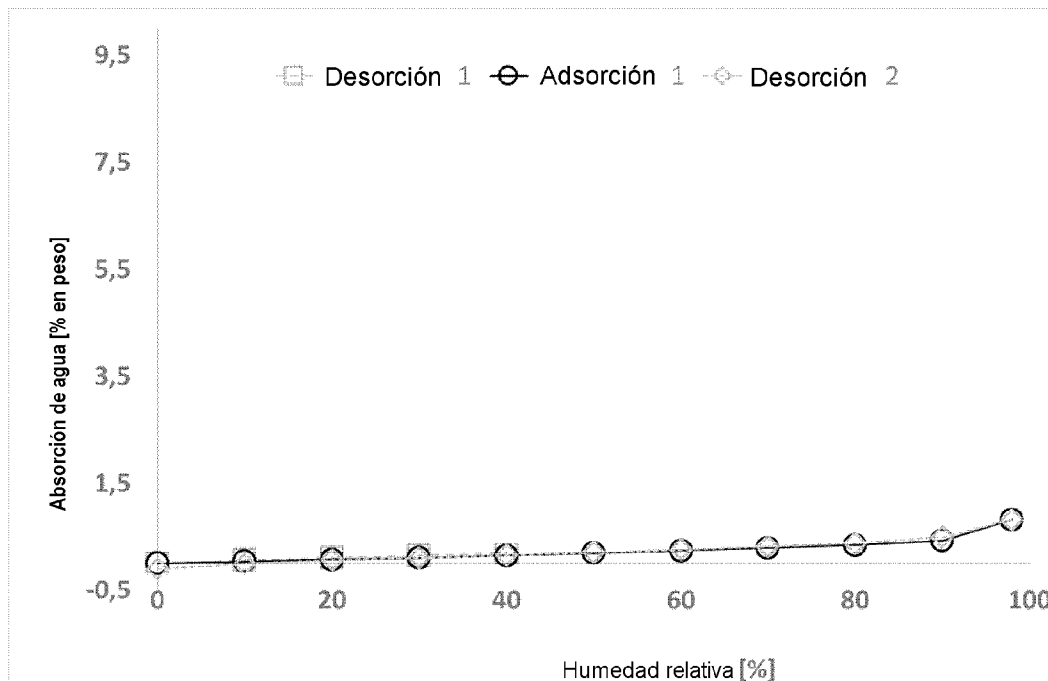
**FIGURA 32:**

Curva de calentamiento por TGA del Fumarato de Compuesto 1 (Forma "NF6")



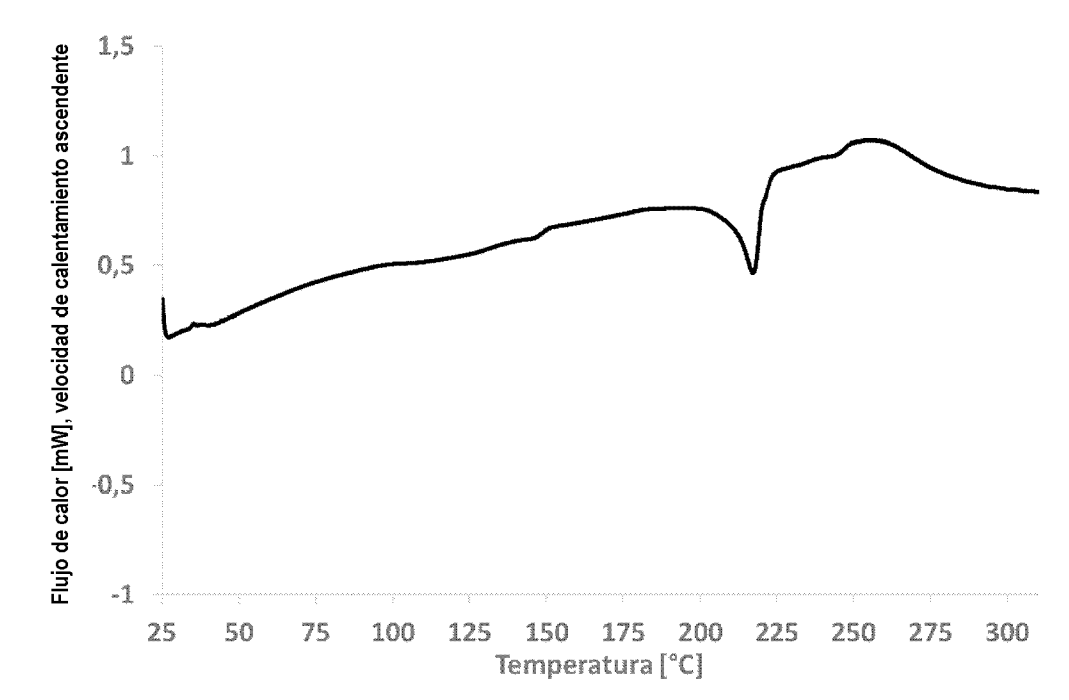
**FIGURA 33:**

Isoterma de absorción de agua DVS (25 °C) del fumarato del compuesto 1 (forma "NF6")



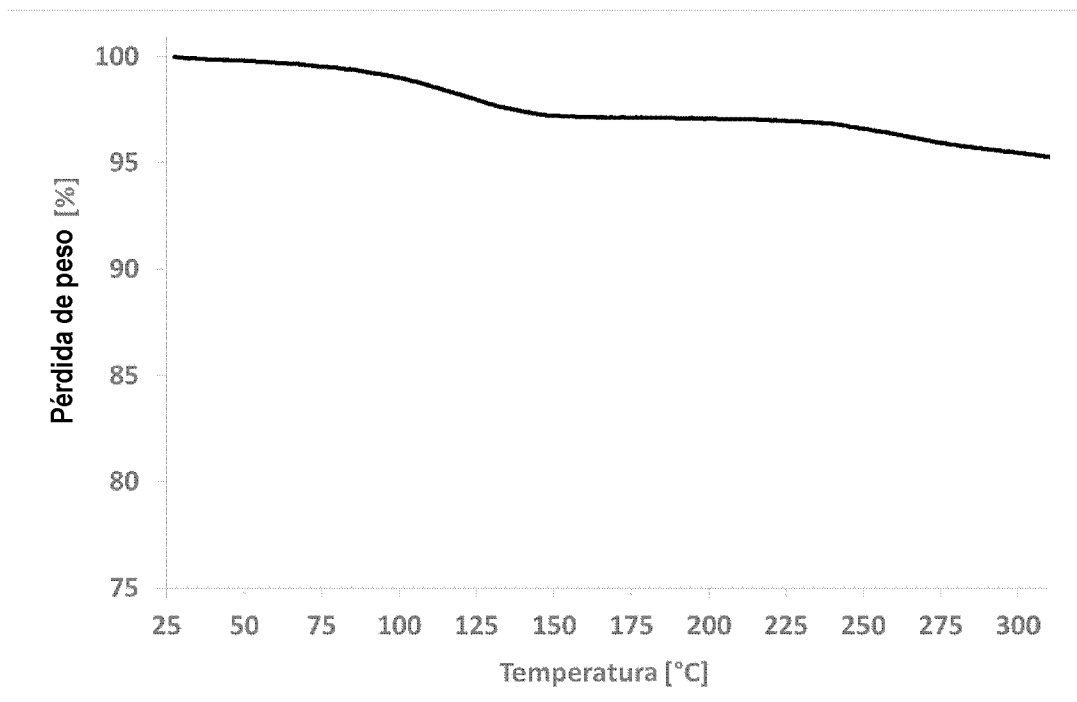
**FIGURA 34:**

**Curva de calentamiento por DSC del napsilato de Compuesto 1 (NF7)**



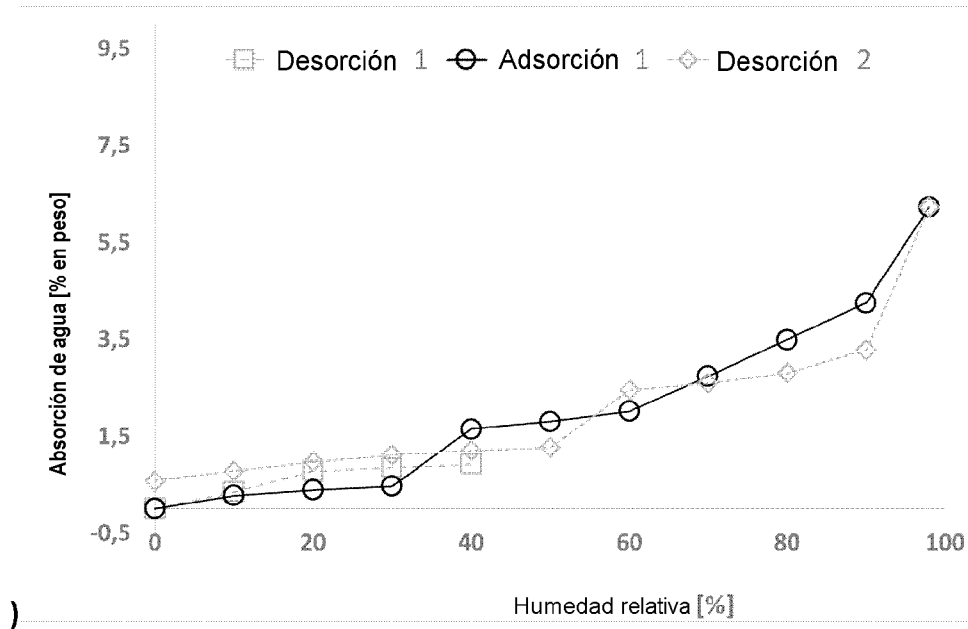
**FIGURA 35:**

**Curva de calentamiento por TGA del napsilato de Compuesto 1 (NF7)**



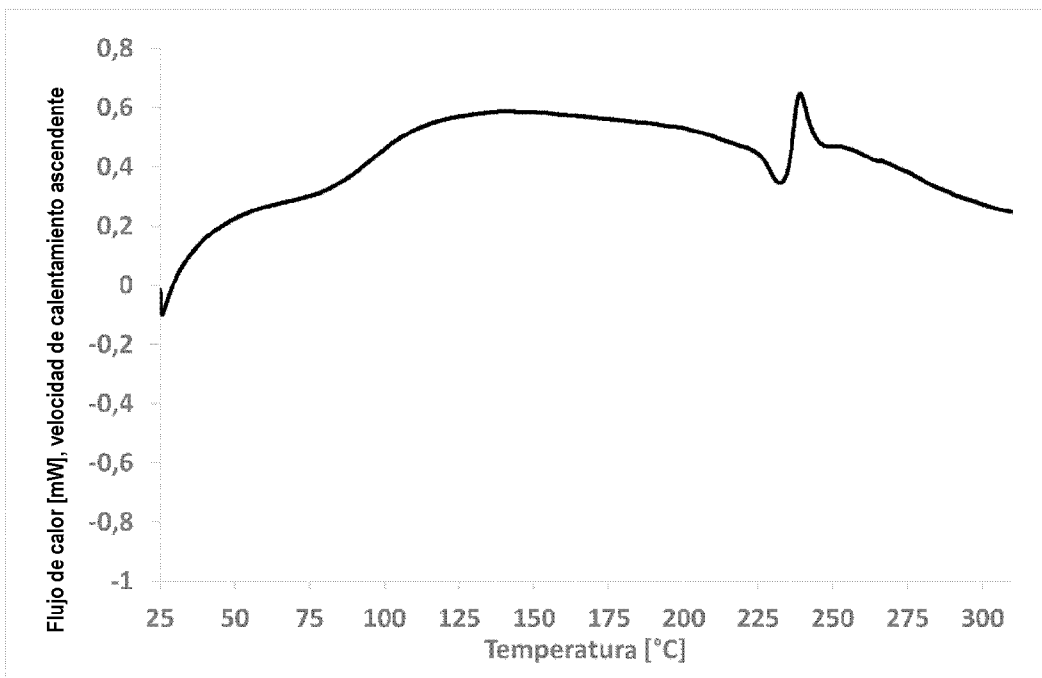
**FIGURA 36:**

**Isoterma de absorción de agua DVS (25 °C) de napsilato de compuesto 1 (NF7)**



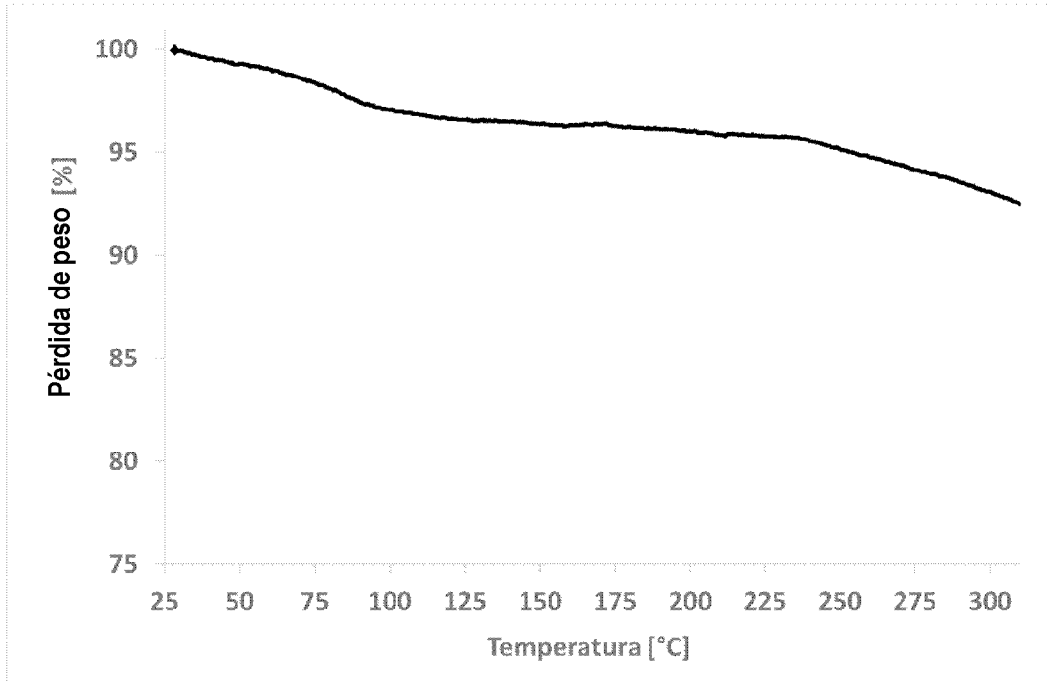
**FIGURA 37:**

**Curva de calentamiento por DSC del Edisilato de Compuesto 1 (NF8)**



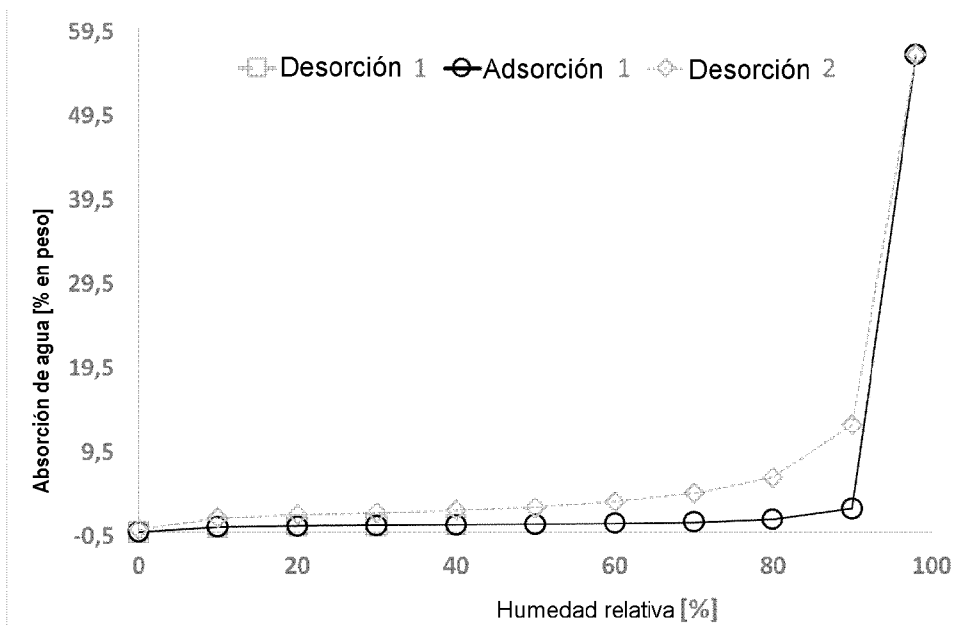
**FIGURA 38:**

**Curva de calentamiento por TGA del Edisilato de Compuesto 1 (NF8)**



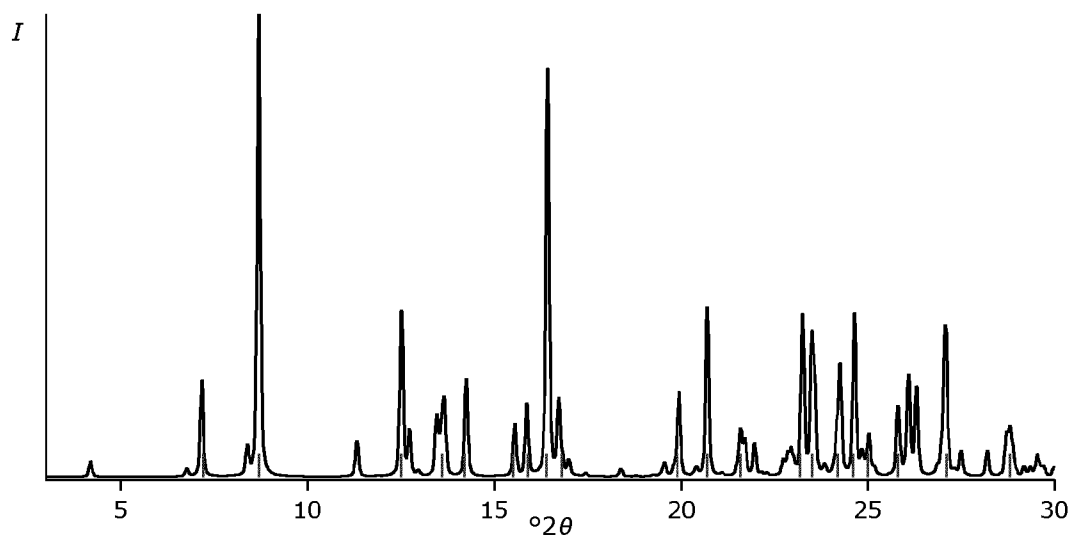
**FIGURA 39:**

**Isoterma de absorción de agua DVS (25 °C) del edisilato de compuesto 1 (NF8)**



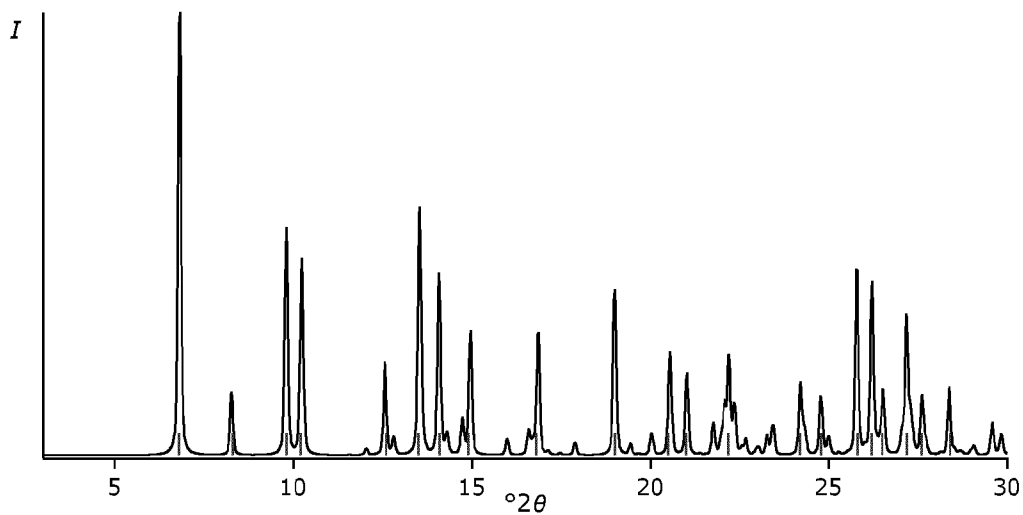
**FIGURA 40:**

**XRPD de un metanolato del Compuesto 1 en forma sólida S1**



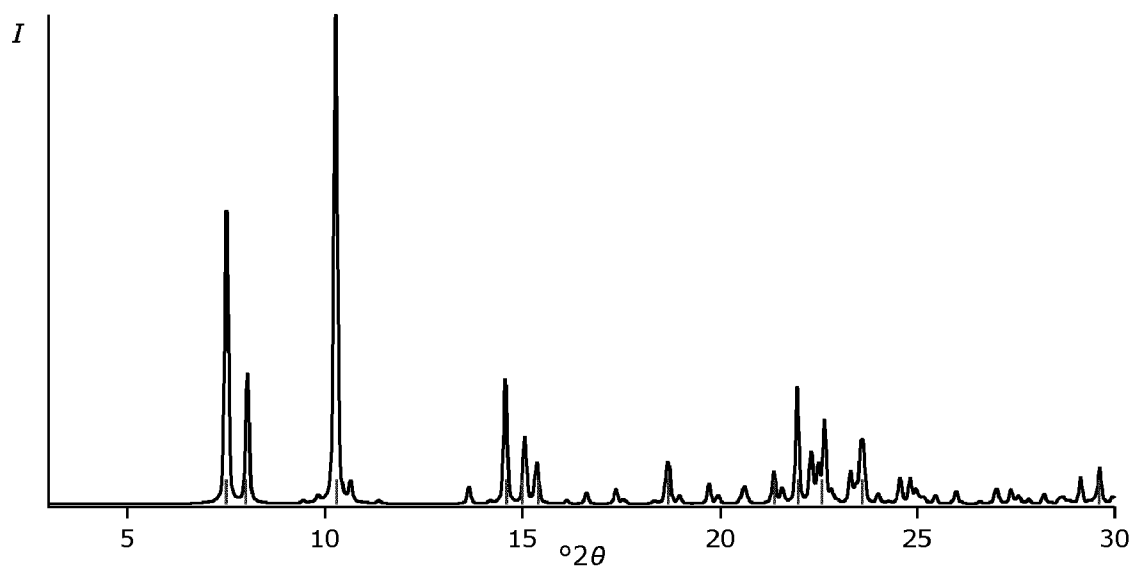
**FIGURA 41:**

**XRPD de un hidrato/metanolato del Compuesto 1 en forma sólida S2**



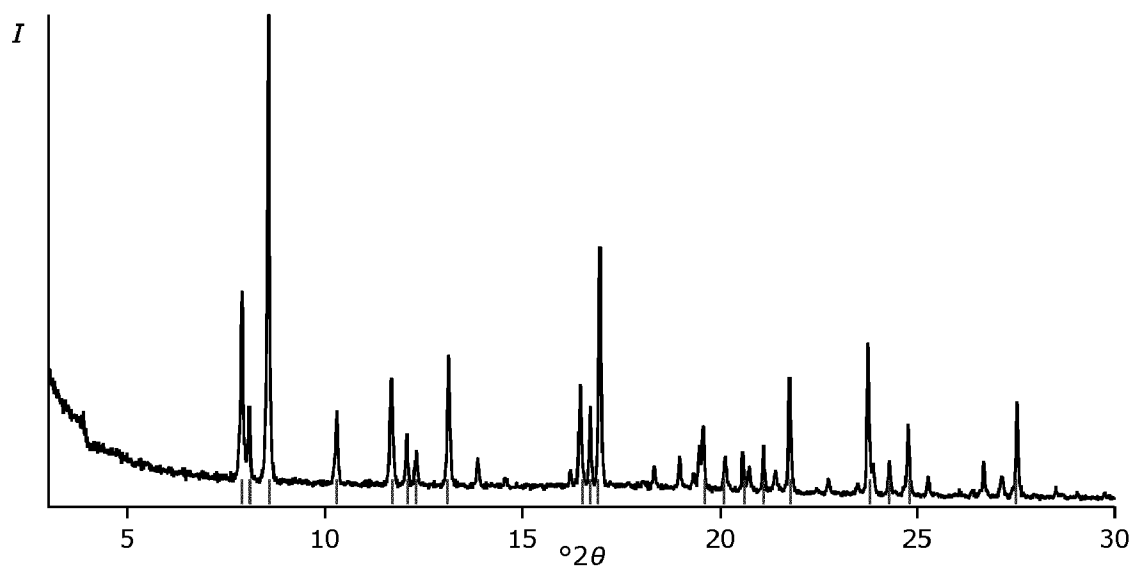
**FIGURA 42:**

**XRPD de un solvato de THF del Compuesto 1 en forma sólida S3**



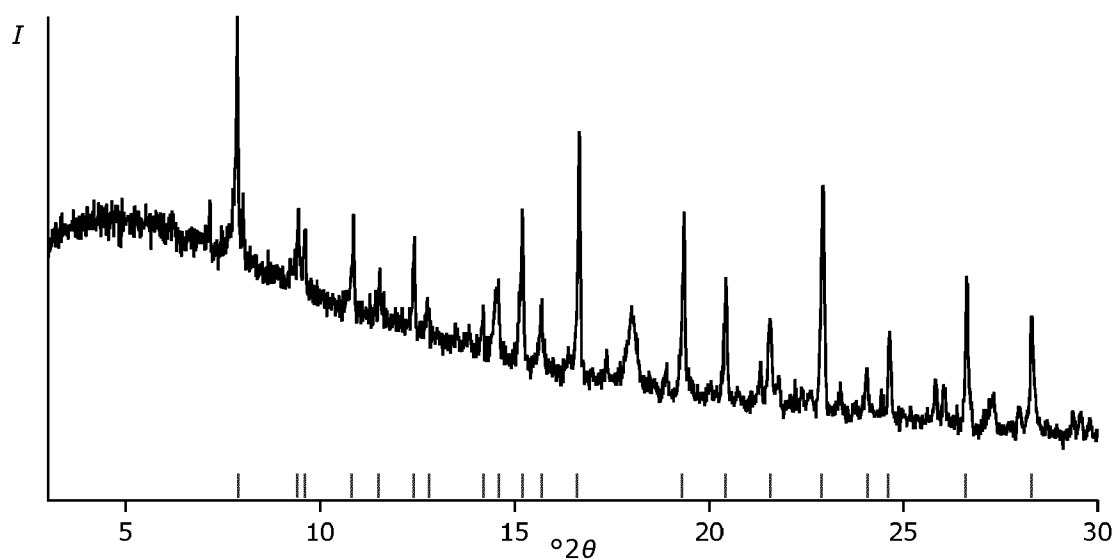
**FIGURA 43:**

**XRPD de un solvato de dioxano del Compuesto 1 en forma sólida NF11**



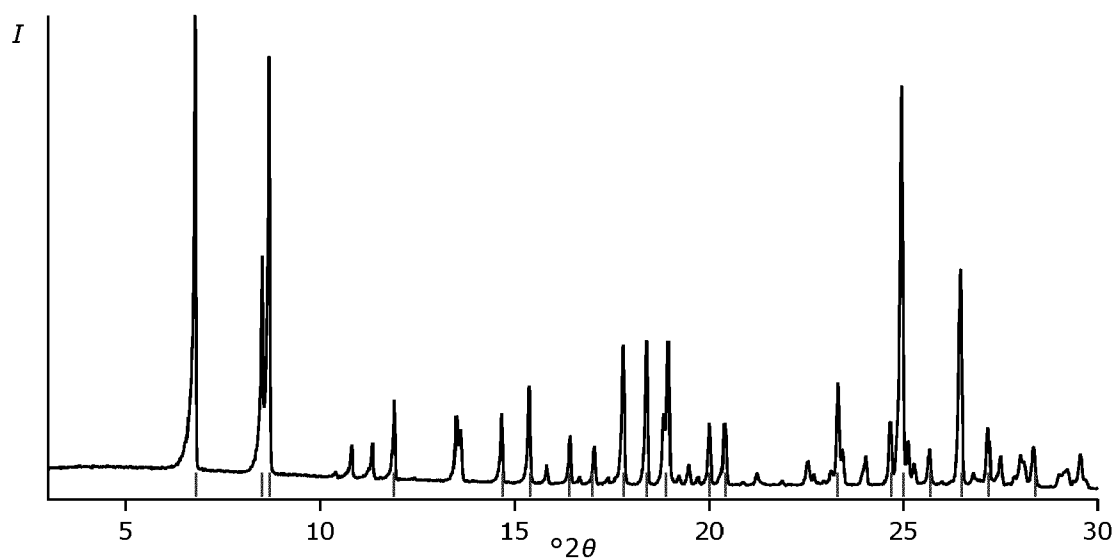
**FIGURA 44:**

XRPD de un solvato de cloroformo del Compuesto 1 en forma sólida NF15



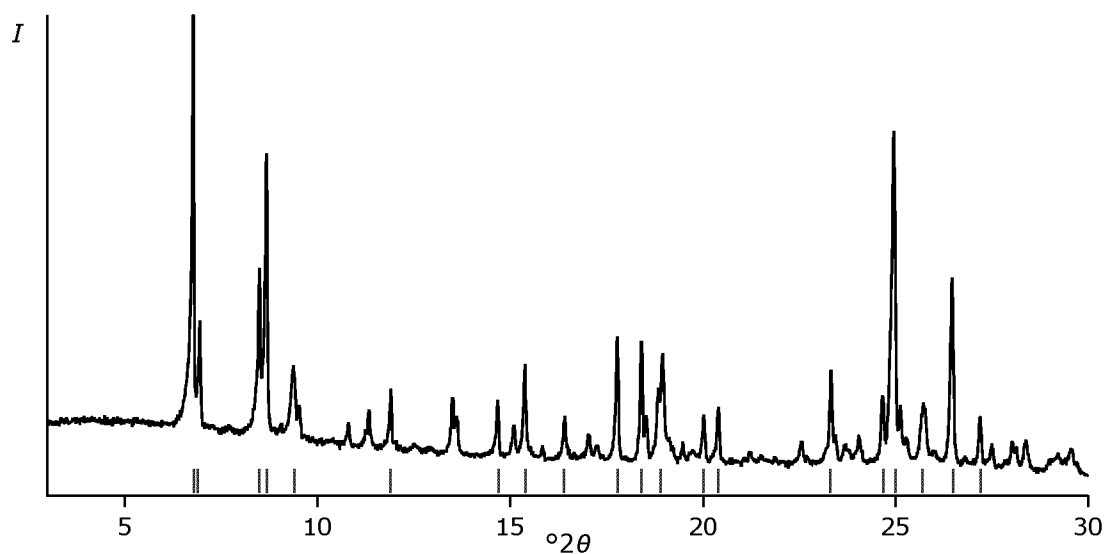
**FIGURA 45:**

XRPD de un solvato de ácido acético del Compuesto 1 en forma sólida NF16



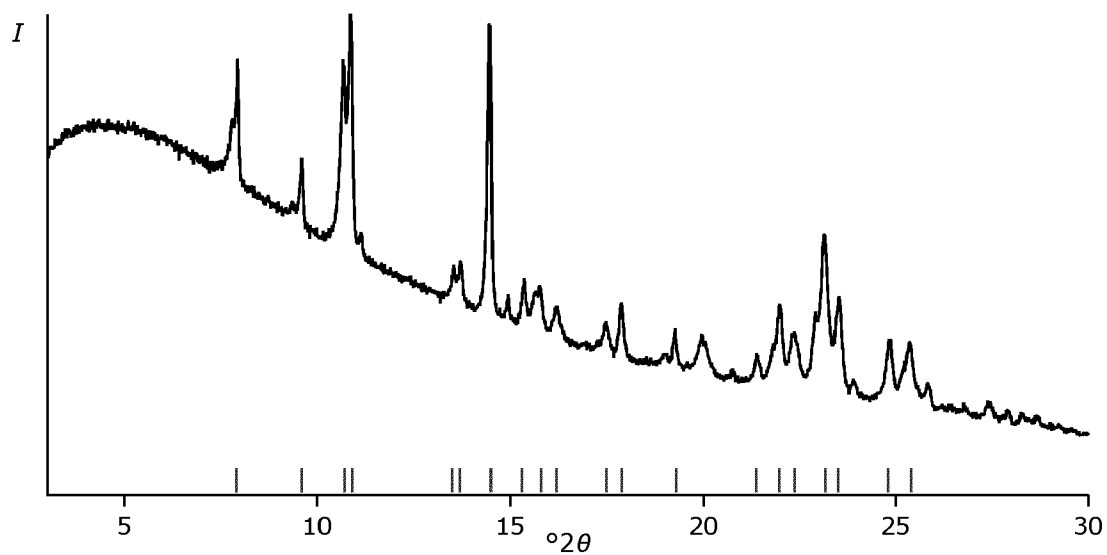
**FIGURA 46:**

XRPD de un solvato de ácido acético del Compuesto 1 en forma sólida NF18



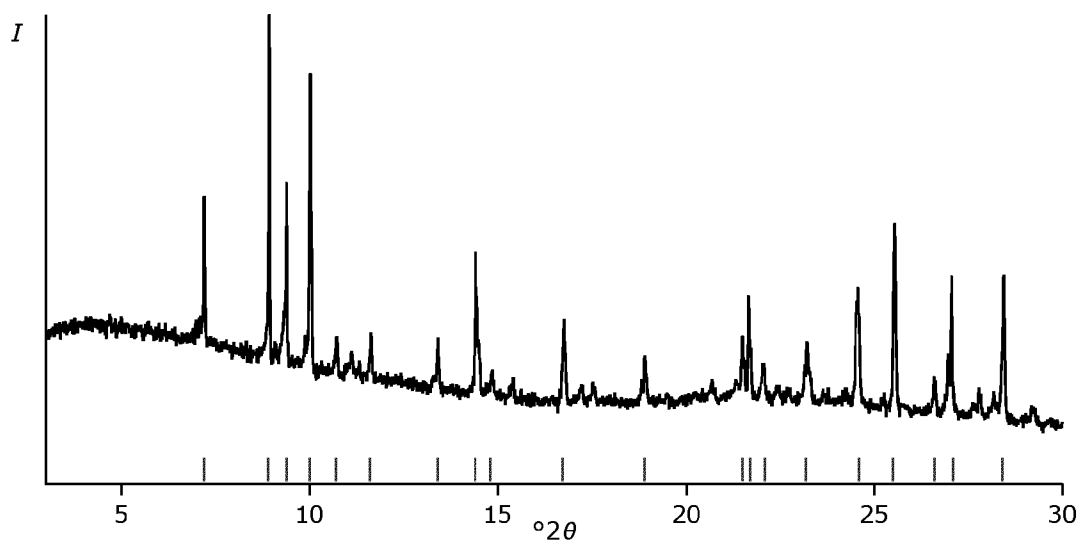
**FIGURA 47:**

XRPD de un solvato de 1,4-dioxano del Compuesto 1 en forma sólida NF29



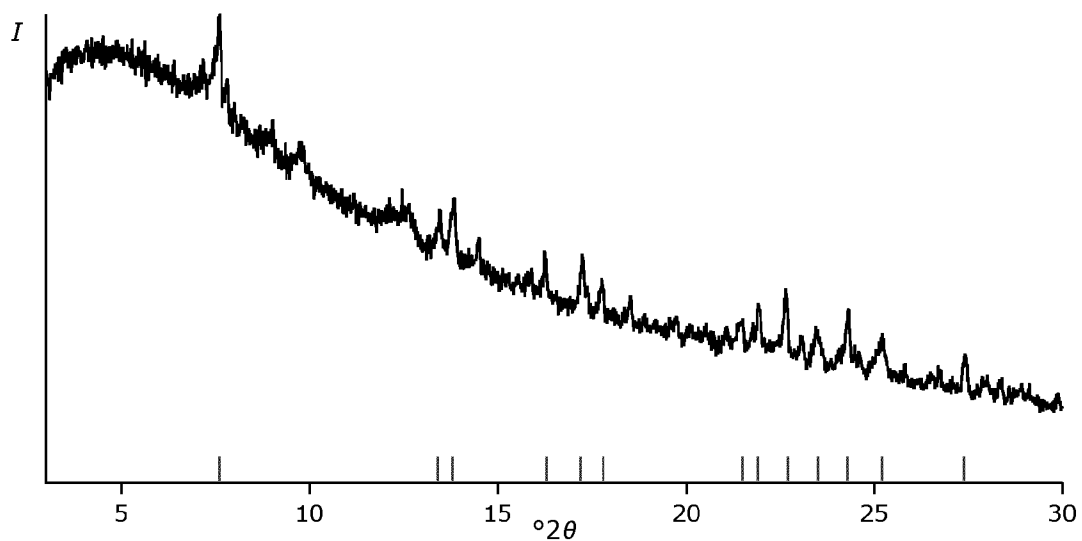
**FIGURA 48:**

XRPD de un solvato de diclorometano del Compuesto 1 en NF32 sólido



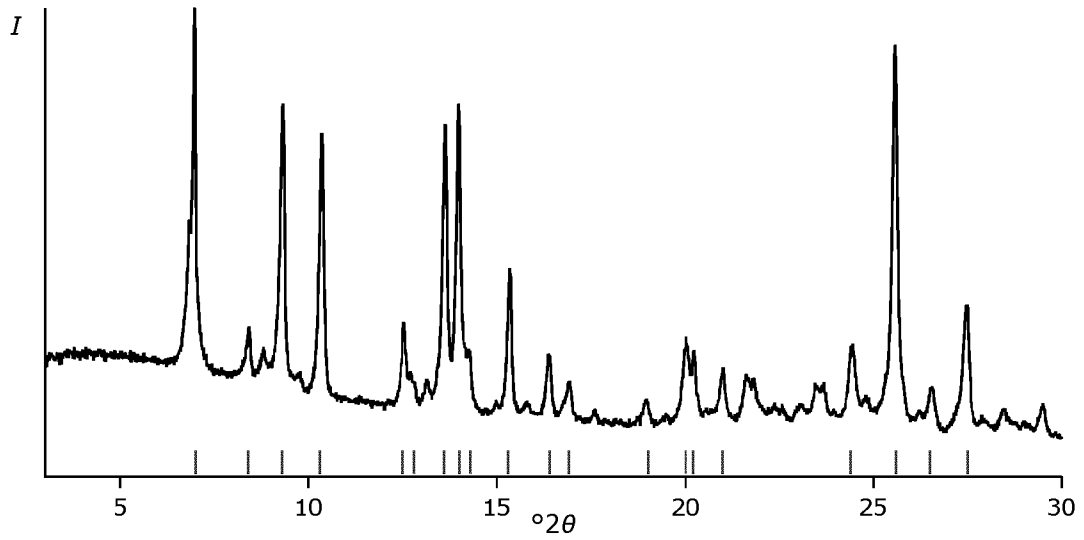
**FIGURA 49:**

XRPD de un solvato de NMP (N-metil-2-pirrolidona) del Compuesto 1 en NF33 sólido



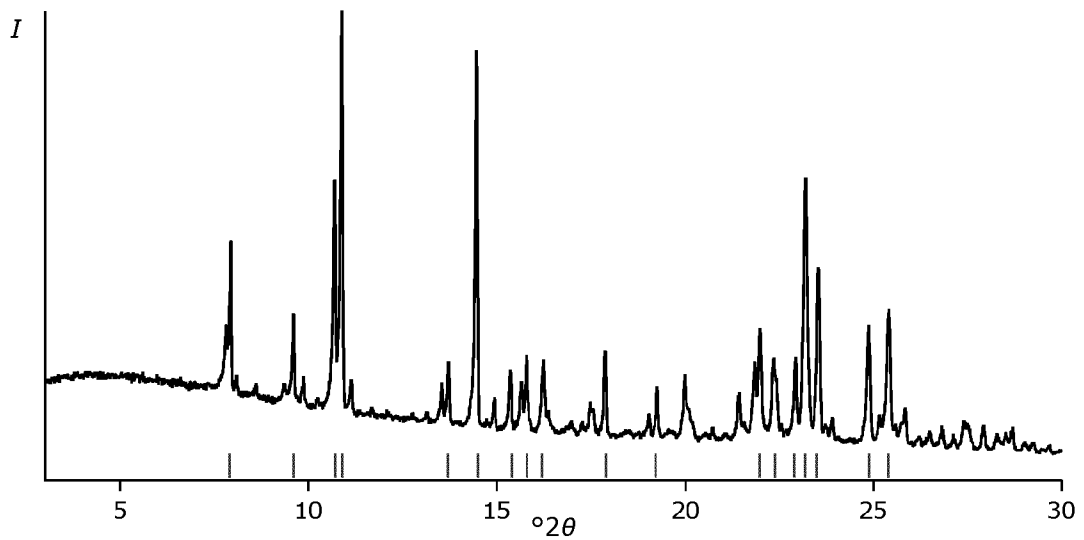
**FIGURA 50:**

**XRPD de un solvato de acetonitrilo del Compuesto 1 en forma sólida NF35**



**FIGURA 51:**

**XRPD de un solvato de 1,4-dioxano del Compuesto 1 en forma sólida NF36**



**FIGURA 52:**

**XRPD de un solvato de dimetilacetamida del Compuesto 1 en forma sólida  
NF37**

