

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 050**

51 Int. Cl.:

**C07D 405/14** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2016 E 21156048 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3842429**

54 Título: **Inhibidores heterocíclicos de ERK1 y ERK2 y su uso en el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

**15.06.2015 US 201562175756 P**

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

**05.12.2022**

73 Titular/es:

**ASANA BIOSCIENCES, LLC (100.0%)  
997 Lenox Drive, Suite 220 Princeton Pike  
Corporate Center  
Lawrenceville, NJ 08648, US**

72 Inventor/es:

**VENKATESAN, ARANAPAKAM M.;  
THOMPSON, SCOTT K.;  
SMITH, ROGER A.;  
REDDY, SANJEEVA P.;  
DEWANG, PURUSHOTTAM M.;  
HALLUR, GURULINGAPPA;  
MULAKALA, CHANDRIKA;  
KETHIRI, RAGHAVA REDDY;  
MULLANGI, RAMESH y  
ZAINUDDIN, MOHD**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 930 050 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

Inhibidores heterocíclicos de ERK1 y ERK2 y su uso en el tratamiento de cáncer

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida o una sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma, que son útiles como inhibidores de ERK1 y ERK2. La presente invención se refiere además a composiciones que contienen dichos compuestos, y dichos compuestos para su uso en un método de tratamiento de una afección tratable mediante la inhibición de ERK1/2.

**Antecedentes**

15 ERK1 y ERK2 (denominadas de manera conjunta "ERK1/2") son proteína-serina/treonina cinasas relacionadas que participan en, entre otras, la vía de transducción de señales Ras-Raf-MEK-ERK, que a veces se denomina como la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés). Se cree que esta vía desempeña un papel central en la regulación de una serie de procesos celulares fundamentales, incluidos uno o más de proliferación, supervivencia, adhesión, progresión del ciclo, migración, diferenciación, metabolismo y transcripción celulares. La activación de la vía de MAPK se ha indicado en numerosos tipos de tumores, incluidos los cánceres de pulmón, colon, pancreático, renal y de ovario. En consecuencia, las sustancias que podrían reducir la activación podrían ser de interés para posibles tratamientos.

25 ERK1/2 parece activarse mediante MEK a través de la fosforilación tanto de un resto de treonina como de tirosina, concretamente en Tyr204/187 y Thr202/185. Una vez activadas, ERK1/2 catalizan la fosforilación de restos de serina/treonina de más de 100 sustratos y activan proteínas tanto citosólicas como nucleares que están vinculadas al crecimiento, proliferación, supervivencia, angiogénesis y diferenciación celulares, todas las características del fenotipo del cáncer. Por lo tanto, puede ser beneficioso dirigirse a ERK para crear y usar inhibidores de ERK1/2 como una forma de inhibir el crecimiento tumoral.

30 Asimismo, un inhibidor de ERK puede tener utilidad en combinación con otros inhibidores de MAPK. Recientemente, los investigadores informaron que la inhibición dual de MEK y ERK por inhibidores de molécula pequeña era sinérgica y actuaba para superar la resistencia adquirida a los inhibidores de MEK. Véase Hatzivassiliou *et al.*, ERK Inhibition Overcomes Acquired Resistance to MEK Inhibition, *Mol. Cancer Ther.* 2012, 11, 1143-1154.

35 Se han informado inhibidores de ERK de molécula pequeña en la bibliografía, incluida la patente de Estados Unidos N.º 6.743.941, la Patente de Estados Unidos. N.º 8.546.404 y Valenzuela *et al.*, Discovery of Highly Potent, Selective and Efficacious Small Molecule Inhibitors of ERK1/2, *J. Med. Chem.*, 2015, 58(4), 1976-1991. Una pequeña cantidad de inhibidores de ERK (p. ej., BVD-523 y GDC-0994) se encuentran en desarrollo clínico temprano. No obstante, no se ha informado que ningún inhibidor de ERK avance a ensayos clínicos en etapa avanzada. Por consiguiente, existe una necesidad continua de crear inhibidores de ERK1/2 mejorados y eficaces para el tratamiento del cáncer.

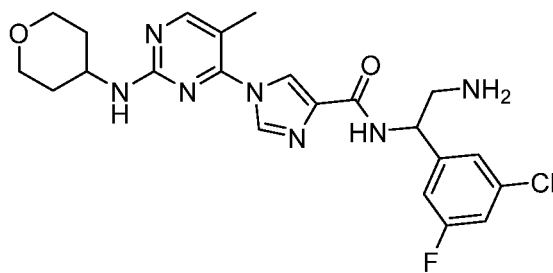
45 El documento WO 2006/071644 A1 (06 de julio de 2006) describe compuestos que son útiles como inhibidores de ERK2 para tratar o disminuir la gravedad de varios trastornos, incluidos los trastornos proliferativos como el cáncer.

El documento WO 2011/060295 A1 (19 de mayo de 2011) describe inhibidores de proteínas cinasa, derivados de pirropirimidina y pirazolopirimidina, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para tratar enfermedades y trastornos de proliferación celular tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, infección, enfermedades cardiovasculares y enfermedades y trastornos neurodegenerativos.

50 El documento WO 2002/064586 A2 (22 de agosto de 2002) describe compuestos que son inhibidores de ERK2 y para el tratamiento de enfermedades en mamíferos que se alivian con un inhibidor de proteína cinasa, particularmente enfermedades como el cáncer, trastornos inflamatorios, reestenosis, diabetes y enfermedades cardiovasculares.

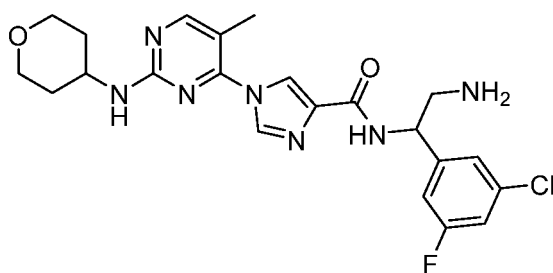
55 **Sumario de la invención**

Un primer aspecto de la invención es un compuesto que es N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



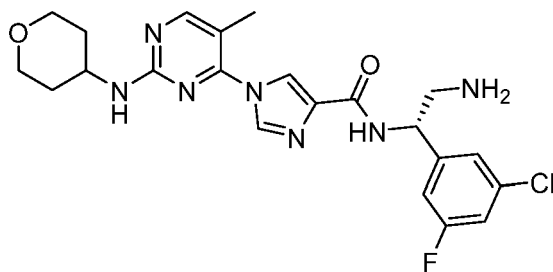
o una sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 5 En una realización, el compuesto es N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



- 10 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

En una realización, el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



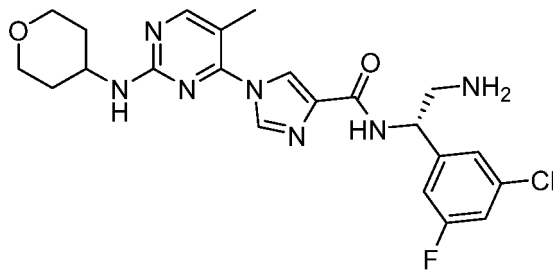
15

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

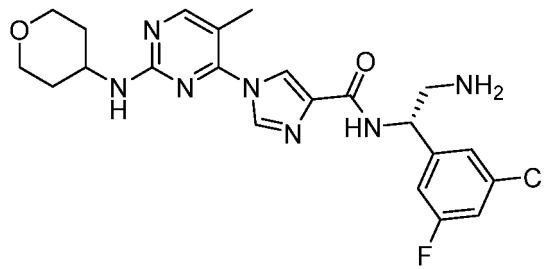
- 20 En una realización, la sal es una sal de un ácido seleccionado de acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, trifluoroacético y canforsulfónico.

En una realización, el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:

25

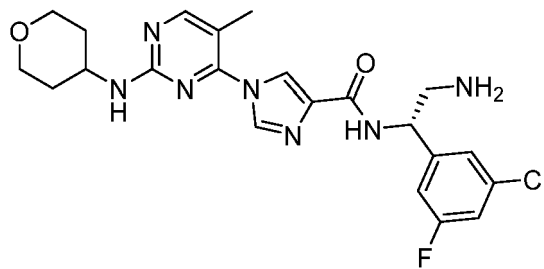


En una realización, el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



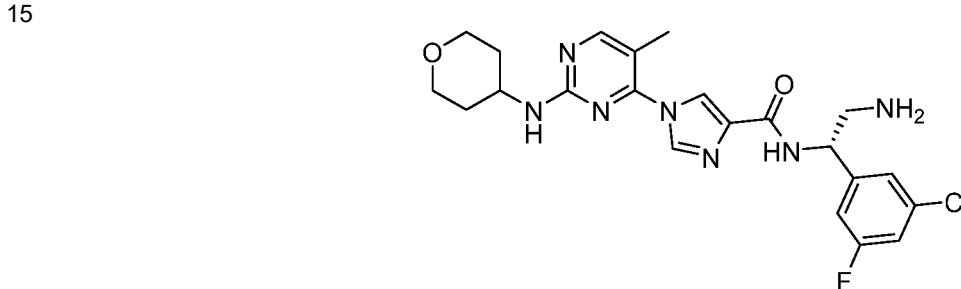
sal de ácido benzenosulfónico.

- 5 En una realización, el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



- 10 sal clorhidrato.

En una realización, el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



sal de ácido mandélico.

- 20 Un segundo aspecto de la invención es una composición que comprende un compuesto del primer aspecto y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la presente invención es un compuesto del primer aspecto para su uso en un método de tratamiento de una afección tratable mediante la inhibición de ERK1/2.

- 25 En una realización, la afección se asocia a una proliferación celular anormal.

30 En una realización, la afección es cáncer de próstata, cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, bronquio, laringe, faringe, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, vejiga, útero, cuello uterino, mama, ovarios, vagina, testículos, piel, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, intestinos, páncreas, cerebro, sistema nervioso central, glándula suprarrenal, piel o una leucemia o linfoma.

En una realización, el método comprende la administración del compuesto semanalmente.

- 35 En una realización, el método comprende la administración del compuesto mensualmente.

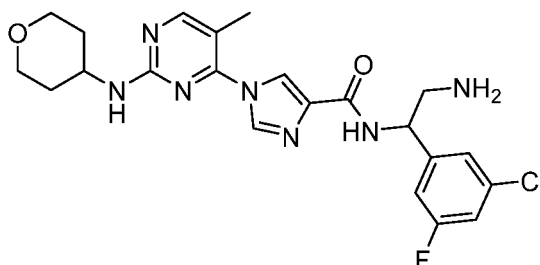
En una realización, el método comprende la administración de dosis equivalentes del compuesto aproximadamente cada semana.

- 40 En una realización, el método comprende la administración de dosis equivalentes del compuesto aproximadamente

cada dos semanas.

### Descripción detallada

- 5 La presente invención proporciona nuevos inhibidores de ERK1 y ERK2, específicamente, un compuesto que es N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



- 10 o una sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

Los compuestos de la invención incluyen sales, solvatos, hidratos, formas racémicas, enantiómeros y mezclas de los mismos, en la medida de lo posible, salvo que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto.

- 15 Las "sales farmacéuticamente aceptables" representativas incluyen, pero sin limitación, sales hidrosolubles e insolubles en agua. En una realización, la sal es de una base. La sal puede ser de una base seleccionada de, por ejemplo, bases de sales de metales alcalinos, tales como sodio, bases de sales de litio o potasio y bases orgánicas, tales como bases de amonio, mono, di y trimetilamonio, mono, di y trietilamonio, mono, di y tripropilamonio, etildimetilamonio, bencildimetilamonio, ciclohexilamonio, bencilamonio, dibencilamonio, piperidinio, morfolinio, pirrolidinio, piperazinio, 1-metilpiperidinio, 4-etilmorfolinio, 1-isopropilpirrolidinio, 1,4-dimetilpiperazinio, 1-n-butil piperidinio, 2-metilpiperidinio, 1-etil-2-metilpiperidinio, mono, di y trietanolamonio, etil dietanolamonio, n-butilmonoetanolamonio, tris(hidroximetil)metilamonio, fenilmonoetanolamonio, entre otras. En otra realización, la sal es de un ácido. La sal puede ser de un ácido seleccionado de, por ejemplo, acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, trifluoroacético, canforsulfónico, entre otras. Opcionalmente, una composición de la invención puede contener tanto una sal farmacéuticamente aceptable como la forma de base libre de un compuesto de la invención.

- 30 El compuesto de la invención puede ser un solvato. Como se usa en el presente documento, "solvato" no altera significativamente la actividad fisiológica o la toxicidad de los compuestos y, como tal, puede funcionar como equivalente farmacológico de los compuestos no solvatados de la invención. El término "solvato" como se usa en el presente documento es una combinación, asociación física y/o solvatación de un compuesto de la presente invención con una molécula de disolvente. Esta asociación física implica unos grados variables de enlace iónico y covalente, incluyendo enlace de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato puede aislarse, tal como cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina de un sólido cristalino. Por lo tanto, "solvato" incluye solvatos tanto en fase de solución como aislables. Un hidrato es una forma especial de solvato que incluye agua combinada en una relación definida como agua de cristalización.

- 40 Los compuestos de la invención contienen un centro asimétrico y, por lo tanto, pueden existir como enantiómeros. Cuando los enlaces al centro quiral se representan gráficamente como líneas rectas en la fórmula de la invención, se entiende que ambas configuraciones (R) y (S) y, por lo tanto, están incluidos ambos enantiómeros y mezclas de los mismos. La presente invención incluye todos los estereoisómeros posibles, a menos que se indique específicamente la estereoquímica específica. Es bien conocido en la técnica cómo preparar estereoisómeros sustancialmente puros, tales como por resolución de formas racémicas o por síntesis de materiales de partida ópticamente activos. En una realización, el compuesto de la invención es un estereoisómero sustancialmente puro. "Estereoisómero sustancialmente puro" se refiere a una forma de estereoisómero que tiene una pureza de al menos el 95 % con respecto a otros estereoisómeros de la misma estructura.

- 50 Las palabras "comprenden", "comprende", y "que comprende" deben interpretarse de manera inclusiva en lugar de exclusiva. Las palabras "consisten", "que consiste" y sus variantes, deben interpretarse exclusivamente, en lugar de inclusivamente.

- 55 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa una variabilidad del 10 % con respecto a la referencia dada, a menos que se indique otra cosa.

Un "paciente" o "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un paciente o sujeto humano o veterinario, por ejemplo, ratón,

rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo o primate no humano, tal como un mono, chimpancé, babuino o gorila.

El término "tratar" o "tratamiento" pretende abarcar la administración a un sujeto de un compuesto de la presente invención con el fin de mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, incluyendo cuidados paliativos.

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad mínima del compuesto activo que efectúa el tratamiento.

10 Las composiciones farmacéuticas útiles en el presente documento contienen al menos uno o más compuestos de la invención o sales, solvatos, hidratos, o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos en un vehículo farmacéuticamente aceptable opcionalmente con otros ingredientes farmacéuticamente inertes o inactivos. En otra realización, un compuesto de la invención está presente en una única composición. En una realización adicional, un compuesto de la invención se combina con uno o más excipientes y/u otros agentes terapéuticos como se describe a continuación.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad de al menos uno o más compuestos de la invención o sales, solvatos, hidratos, o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos que es eficaz para tratar una afección tratable mediante la inhibición de ERK1/2 en un sujeto que lo necesite. Concretamente, la dosificación del compuesto de la invención para lograr un efecto terapéutico dependerá de la formulación, edad, peso y sexo del paciente y vía de suministro. También se contempla que el tratamiento y la dosificación del compuesto de la invención pueden administrarse en forma de dosificación unitaria y que un experto en la materia ajustaría la forma de dosificación unitaria en consecuencia para reflejar el nivel relativo de actividad. La decisión sobre la dosis particular que se empleará (y el número de veces que se administrará por día) queda a criterio del médico con experiencia habitual, y puede variarse ajustando la dosis a las circunstancias particulares para producir el efecto terapéutico deseado. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es inferior a aproximadamente 5 g/kg, aproximadamente 500 mg/kg, aproximadamente 400 mg/kg, aproximadamente 300 mg/kg, aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 75 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 25 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg o aproximadamente 1 µg/kg. No obstante, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención puede determinarse por el médico responsable y depende de la afección tratada, el compuesto administrado, la vía de suministro, la edad, el peso, la gravedad de los síntomas del paciente y el patrón de respuesta del paciente.

35 Las cantidades terapéuticamente eficaces pueden proporcionarse en un programa regular, es decir, diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente o en un programa irregular con días, semanas, meses de administración variables, etc. Como alternativa, la cantidad terapéuticamente eficaz a administrar puede variar. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz para la primera dosis es mayor que la cantidad terapéuticamente eficaz para una o más de las dosis posteriores. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz para la primera dosis es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz para una o más de las dosis posteriores. Se pueden administrar dosis equivalentes durante varios períodos de tiempo, entre los que se incluyen, pero sin limitación, aproximadamente cada 2 horas, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 8 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 36 horas, aproximadamente cada 48 horas, aproximadamente cada 72 horas, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada tres semanas, aproximadamente cada mes y aproximadamente cada dos meses. El número y la frecuencia de las dosis correspondientes a un curso completo de terapia se determinarán según el criterio de un profesional de la salud. Las cantidades terapéuticamente eficaces descritas en el presente documento se refieren a las cantidades totales administradas durante un período de tiempo dado; es decir, si se administra más de un compuesto de la invención o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, las cantidades terapéuticamente eficaces corresponden a la cantidad total administrada.

55 Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de la invención pueden formularse solas o con uno o más vehículos farmacéuticos para su administración. La cantidad de uno o más vehículos farmacéuticos está determinada por la solubilidad y la naturaleza química del compuesto de la invención, la vía de administración seleccionada y la práctica farmacológica convencional. El uno o más vehículos farmacéuticos pueden ser sólidos o líquidos y pueden incorporar vehículos tanto sólidos como líquidos. Se conoce varios vehículos líquidos adecuados y un experto en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Dichos vehículos pueden incluir, por ejemplo, DMSO, solución salina, solución salina tamponada, hidroxipropilciclodextrina y mezclas de los mismos. De forma similar, los expertos en la materia conocen varios vehículos y excipientes sólidos. Los componentes de la invención pueden administrarse por cualquier vía, teniendo en cuenta la afección específica para la que se ha seleccionado. Los compuestos de la invención pueden suministrarse por vía oral, por inyección, inhalación (incluyendo por vía oral, intranasal e intratraqueal), por vía ocular, por vía transdérmica, por vía intravascular, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía sublingual, por vía intracraneal, por vía epidural, por vía rectal y por vía vaginal, entre otras.

65 Aunque el compuesto de la invención puede administrarse solo, también se puede administrar en presencia de uno o más vehículos farmacéuticos que sean fisiológicamente compatibles. Los vehículos pueden estar en forma seca o de

- líquido, y deben ser farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas líquidas son, normalmente, soluciones o suspensiones estériles. Cuando se utilizan vehículos líquidos para la administración parenteral, deseablemente, son líquidos estériles. Los vehículos líquidos se utilizan normalmente en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. En una realización, el compuesto de la invención se disuelve en un vehículo líquido. En otra realización, el compuesto de la invención se suspende en un vehículo líquido. Un experto en la materia de las formulaciones podrá seleccionar un vehículo líquido adecuado, dependiendo de la vía de administración. El compuesto de la invención se puede formular alternativamente en un vehículo sólido. En una realización, la composición se puede compactar en una forma farmacéutica unitaria, es decir, comprimido o cápsula oblonga. En otra realización, la composición se puede añadir a la forma farmacéutica unitaria, es decir, una cápsula.
- En una realización adicional, la composición se puede formular para administrarse en forma de polvo. El vehículo sólido puede realizar varias funciones, es decir, puede realizar las funciones de dos o más de los excipientes descritos a continuación. Por ejemplo, el vehículo sólido también puede actuar como agente aromatizante, lubricante, solubilizante, agente de suspensión, carga, deslizante, adyuvante de la compresión, aglutinante, disgregante o material de encapsulación.
- La composición también se puede subdividir para que contenga cantidades apropiadas del compuesto de la invención. Por ejemplo, la dosis unitaria puede ser composiciones envasadas, por ejemplo, polvos envasados, viales, ampollas, jeringas precargadas o sobres que contengan líquidos.
- Los ejemplos de excipientes que se pueden combinar con uno o más compuestos de la invención incluyen, sin limitación, adyuvantes, antioxidantes, aglutinantes, tampones, recubrimientos, sustancias colorantes, adyuvantes de la compresión, diluyentes, disgregantes, emulsionantes, emolientes, materiales de encapsulación, cargas, agentes aromatizantes, abrillantadores, agentes de granulación, lubricantes, quelatos metálicos, osmorreguladores, ajustadores del pH, conservantes, solubilizantes, sorbentes, estabilizantes, edulcorantes, tensioactivos, agentes de suspensión, jarabes, agentes espesantes o reguladores de la viscosidad. Véase, por ejemplo, los excipientes descritos en "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 5.ª edición, Eds.: Rowe, Sheskey y Owen, APhA Publications (Washington, DC), 14 de diciembre de 2005.
- En una realización, las composiciones se pueden utilizar como inhalantes. Para esta vía de administración, las composiciones se pueden preparar como dosis unitarias fluidas usando un compuesto de la invención y un vehículo para la administración mediante una bomba de pulverización por atomización o mediante polvo seco para insuflación.
- En otra realización, las composiciones se pueden utilizar como aerosoles, es decir, oral o intranasal. Para esta vía de administración, las composiciones están formuladas para su uso en un recipiente de aerosol presurizado junto con un propulsor gaseoso o licuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, dióxido de carbono, nitrógeno y propano. También se proporciona el suministro de una dosis medida en una o más actuaciones.
- En otra realización, las composiciones pueden administrarse mediante un dispositivo de suministro sostenido. "Suministro sostenido", tal como se usa en el presente documento, se refiere al suministro de un compuesto de la invención que se retrasa o se controla de otro modo. Los expertos en la materia conocen dispositivos de suministro sostenido adecuados. Para su uso en tales dispositivos de suministro sostenido, el compuesto de la invención se formula como se describe en el presente documento.
- Además de los componentes descritos anteriormente para su uso en la composición y el compuesto de la invención, las composiciones y kits descritos en el presente documento pueden contener uno o más medicamentos o agentes terapéuticos. En una realización, las composiciones y kits descritos en el presente documento pueden contener uno o más medicamentos o agentes terapéuticos que se usan para tratar cánceres, incluyendo, por ejemplo, cánceres caracterizados por tumores, incluyendo tumores sólidos y cánceres de tumores "líquidos" o no sólidos (p. ej., linfoma). En una realización, el medicamento es un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los enumerados en "Physician's Desk Reference", 64ª edición, Thomson Reuters, 2010. Las cantidades terapéuticamente eficaces del uno o más medicamentos o agentes terapéuticos adicionales son bien conocidas por los expertos en la materia. No obstante, el médico responsable puede determinar la cantidad de otros medicamentos que se debe suministrar.
- Los compuestos de la invención y/o el uno o más medicamentos o agentes terapéuticos diferentes pueden administrarse en una única composición. No obstante, la presente invención no está tan limitada. En otras realizaciones, los compuestos de la invención se pueden administrar en una o más formulaciones separadas de otros compuestos de la invención, agentes quimioterapéuticos u otros agentes que se desee.
- También se proporcionan en el presente documento kits o envases de formulaciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención o las composiciones descritas en el presente documento. Los kits pueden organizarse para indicar una única formulación o combinación de formulaciones que se tomarán en cada momento deseado.
- De manera adecuada, el kit contiene un envase o un recipiente con el compuesto de la invención formulado para la vía de suministro deseada. De manera adecuada, el kit contiene instrucciones sobre la dosificación y un prospecto sobre el principio activo. Opcionalmente, el kit puede contener además instrucciones para monitorizar los niveles

circulantes del producto y los materiales para realizar dichos ensayos, incluidos, por ejemplo, reactivos, placas de pocillos, recipientes, marcadores o etiquetas. Dichos kits se envasan fácilmente de una manera adecuada para el tratamiento de una indicación deseada. Por ejemplo, el kit también puede contener instrucciones para el uso de una bomba de pulverización u otro dispositivo de suministro. Otros componentes adecuados para incluir en dichos kits serán fácilmente evidentes para un experto en la materia, teniendo en cuenta la indicación deseada y la vía de suministro.

Los compuestos o las composiciones de la invención descritos en el presente documento pueden ser de dosis única o para administración continua o discontinua periódica. Para la administración continua, un envase o kit puede incluir el compuesto de la invención en cada unidad de dosificación (por ejemplo, solución, loción, comprimido, píldora u otra unidad descrita anteriormente o utilizada en el suministro de fármacos), y opcionalmente instrucciones para administrar las dosis diariamente, semanalmente o mensualmente, durante un período de tiempo predeterminado o según lo prescrito. Cuando el compuesto de la invención se va a suministrar periódicamente de manera discontinua, un envase o kit puede incluir placebos durante los períodos en los que no se suministra el compuesto de la invención. Cuando se desea variar las concentraciones de una composición, de los componentes de la composición, o las proporciones relativas de los compuestos de la invención o agentes dentro de una composición a lo largo del tiempo, un envase o kit puede contener una secuencia de unidades de dosificación que proporcionen la variabilidad deseada.

Se conocen en la técnica varios envases o kits para dispensar agentes farmacéuticos para uso oral periódico. En una realización, el envase tiene indicadores para cada período. En otra realización, el envase es un blíster etiquetado, envase dispensador de dial o botella.

El propio medio de envasado de un kit puede estar diseñado para la administración, tal como un inhalante, jeringa, pipeta, gotero ocular u otros aparatos similares, desde el que puede aplicarse la formulación a un área afectada del cuerpo, tales como los pulmones, inyectarse en un sujeto y/o incluso aplicarse a y/o mezclarse con los otros componentes del kit.

Las composiciones de estos kits también se pueden proporcionar en formas secas o liofilizadas. Cuando los reactivos o los componentes se proporcionan como una forma en seco, la reconstitución es normalmente mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otro envase.

Los kits también incluirán normalmente un medio para contener los viales en confinamiento cerrado para la venta comercial, tal como, por ejemplo, recipientes de plástico inyectables o moldeados por soplado en los que se conservan los viales deseados. Independientemente del número o tipo de envases y como se analiza anteriormente, los kits también pueden incluir, o estar envasados con, un instrumento separado para ayudar con la inyección/administración o colocación de la composición dentro del cuerpo de un animal. Dicho instrumento puede ser un inhalante, jeringa, pipeta, pinzas, cuchara de medición, gotero ocular o cualquier medio de suministro aprobado médicamente de este tipo.

En una realización, se proporciona un kit y contiene un compuesto de la invención. El compuesto de la invención puede estar en presencia o ausencia de uno o más de los vehículos o excipientes descritos anteriormente. El kit puede contener opcionalmente instrucciones para administrar el medicamento y el compuesto de la invención a un sujeto que tenga una enfermedad caracterizada por la desregulación de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK.

En una realización adicional, se proporciona un kit que contiene un compuesto de la invención en una segunda unidad de dosificación y uno o más de los vehículos o excipientes descritos anteriormente en una tercera unidad de dosificación. El kit puede contener opcionalmente instrucciones para administrar el medicamento y el compuesto de la invención a un sujeto que tenga una enfermedad caracterizada por la desregulación de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK.

Los compuestos descritos en el presente documento son útiles para regular afecciones que están asociadas a las vías de RAS/RAF/MEK/ERK. En una realización, dicha enfermedad está asociada a una proliferación celular anormal. La expresión "proliferación celular anormal" se refiere al crecimiento descontrolado de células que están naturalmente presentes en el cuerpo de un mamífero. En una realización, una enfermedad que se caracteriza por una proliferación celular anormal es cáncer, incluyendo, sin limitación, cáncer de próstata, cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, bronquio, laringe, faringe, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, vejiga, útero, cuello uterino, mama, ovarios, vagina, testículos, piel, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, intestinos, páncreas, cerebro, sistema nervioso central, glándula suprarrenal, piel o una leucemia o linfoma. En una realización, la enfermedad caracterizada por la proliferación celular anormal es melanoma, cáncer de piel o cáncer de pulmón, colon, mama o próstata. En otra realización, la proliferación celular anormal se asocia a un tumor sólido o un cáncer hematológico.

El término "regulación" o variaciones del mismo como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para inhibir uno o más componentes de una vía biológica. En una realización, "regulación" se refiere a la inhibición de la actividad de ERK1/2. En otra realización más, la regulación incluye la inhibición de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK.

La actividad de los compuestos de la invención se estableció en múltiples ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se demostró que los compuestos de la invención provocan la inhibición de las actividades enzimáticas de ERK1 y ERK2 en ensayos bioquímicos utilizando una técnica de fluorescencia homogénea resuelta en tiempo (HTRF, por sus siglas en inglés); los datos representativos se proporcionan en la **tabla 2**. Asimismo, se encontró que los compuestos de la invención eran activos en un ensayo mecánico basado en células; es decir, se demostró que los compuestos de la invención inhiben la fosforilación de RSK1 (S380) (la proteína diana cadena abajo de ERK1/2) mediante un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los datos representativos se proporcionan en la **tabla 2**. La utilidad funcional de los compuestos de la invención se demostró por su actividad en ensayos *in vitro* de proliferación de células tumorales en un panel de líneas de células tumorales con mutaciones en la vía de RAS/BRAF/MEK/ERK; los datos representativos se proporcionan de nuevo en la **tabla 2**. Los compuestos de la invención presentan actividad inhibidora de ERK1/2 y, por lo tanto, pueden utilizarse para inhibir el crecimiento celular anormal en el que desempeña un papel la vía de RAS/RAF/MEK/ERK. Por lo tanto, los compuestos de la invención son eficaces en el tratamiento de trastornos con los que están asociadas acciones anormales de crecimiento celular de la desregulación de RAS/RAF/MEK/ERK, tales como cáncer. Un experto en la materia reconocería que existe un vínculo establecido entre la actividad en los ensayos de proliferación de células tumorales *in vitro* y la actividad antitumoral en el entorno clínico. Por ejemplo, la utilidad terapéutica de varios agentes farmacéuticos, por ejemplo, taxol (Silvestrini, Stem Cells, 1993, 11(6):528-535), taxotere (Bissery, Anti Cancer Drugs, 1995, 6(3):330) e inhibidores de topoisomerasa (Edelman, Cancer Chemother. Pharmacol., 1996, 37(5):385-39), se ha demostrado utilizando ensayos de proliferación tumoral *in vitro*.

Finalmente, se demostró que los compuestos de la invención inhiben el crecimiento tumoral *in vivo* tras la dosificación de los compuestos en modelos de xenoinjerto tumoral humano, tal como el modelo de xenoinjerto de melanoma humano A375 que alberga la mutación B-RAF V600E, el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano HT-29 que alberga la mutación B-RAF V600E, el modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano HCT116 que alberga la mutación KRAS, el modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón humano A549 que alberga la mutación KRAS, y el modelo de xenoinjerto de carcinoma pancreático humano BxPC3. También se demostró que los compuestos inhiben el nivel de fosfo-RSK en los tumores en el modelo de xenoinjerto A375, tras el tratamiento con compuestos; esto indica una inhibición eficaz de las proteínas diana ERK1/2 *in vivo* por compuestos de la invención. Un experto en la materia reconocería que existe un vínculo establecido entre la actividad en modelos de xenoinjerto de tumores humanos y la actividad antitumoral en el entorno clínico.

Los compuestos de la invención que tienen una utilidad particularmente prometedora pueden identificarse utilizando los ensayos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, los compuestos de la invención que se encuentra que presentan valores de  $CI_{50}$  inferiores a 100 nM en los ensayos bioquímicos de ERK1/2, y valores de  $CI_{50}$  inferiores a 500 nM en los ensayos de proliferación celular y fosfo-RSK1, y que causan una inhibición del crecimiento tumoral del 40 % o más en uno o más modelos de xenoinjerto tumoral humano, serían identificados como compuestos particularmente útiles.

Los métodos para regular la vía de RAS/RAF/MEK/ERK se describen en el presente documento (pero no forman parte de la invención) e incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención a un paciente que lo necesite.

Los métodos para inhibir ERK1/2 se describen en el presente documento (pero no forman parte de la invención) e incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención a un paciente que lo necesite.

Los métodos para tratar una enfermedad caracterizada por un crecimiento celular anormal resultante de una vía de RAS/RAF/MEK/ERK desregulada se describen en el presente documento (pero no forman parte de la invención) e incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención a un paciente que lo necesite.

Los métodos para tratar una afección tratable mediante la inhibición de ERK1/2 se describen en el presente documento (pero no forman parte de la invención) e incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención a un paciente que lo necesite.

Como se describe en el presente documento, "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto cuando se usa para el tratamiento de una afección es una cantidad que al menos retrasa la progresión de la afección. "Una cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto cuando se usa para el tratamiento del cáncer es una cantidad que puede retrasar la progresión del cáncer, reduce la cantidad de células cancerosas en los fluidos (p. ej., sangre, células periféricas o fluidos linfáticos), reduce el tamaño tumoral, inhibe la metástasis, inhibe el crecimiento tumoral y/o mejora uno o más de los síntomas del cáncer. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad y/o determinando la tasa de respuesta.

## PROCESO DE PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los métodos útiles para preparar los compuestos de la invención se exponen en los ejemplos. Un experto en la materia

reconocerá que los procesos se pueden adaptar para producir otros compuestos y sus sales, solvatos, hidratos farmacéuticamente aceptables o estereoisómeros de los compuestos de la invención.

- 5 En las siguientes reacciones descritas para preparar compuestos descritos en el presente documento, puede ser necesario proteger grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, que se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Se pueden usar grupos protectores convencionales según las prácticas convencionales, por ejemplo, véase Green *et al.*, Protective Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons, 1991.
- 10 Se usan las siguientes abreviaturas y tienen las definiciones indicadas: MHz es megahercio (frecuencia), m es multiplete, t es triplete, d es doblete, s es singulete, a es ancho, CDCl<sub>3</sub> es cloroformo deuterado, calcd es calculado, min es minutos, h es horas, g es gramos, mmol es milimoles, ml es mililitros, N es Normal (concentración), M es molaridad (concentración), μM es micromolar, ee es exceso enantiomérico, °C es grado centígrado, HPLC es cromatografía de líquidos de alto rendimiento, LC-MS es cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas, mp es punto de fusión, RMN es resonancia magnética nuclear, TLC es cromatografía en capa fina, THF es tetrahidrofurano, MeOH es metanol, DCM es diclorometano, DMF es *N,N*-dimetil formamida, DMSO es dimetilsulfóxido, EtOH es alcohol etílico, EtOAc es acetato de etilo, MeOH es metanol, TA es temperatura ambiente, HCl es cloruro de hidrógeno o ácido clorhídrico, TFA es ácido trifluoroacético, EtMgBr es bromuro de etilmagnesio, *n*-BuLi es *n*-butil-litio, NaHCO<sub>3</sub> es bicarbonato sódico, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> es carbonato sódico, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es sulfato sódico, NMP es *N*-metil-2-pirrolidona, EDC o EDC.HCl es clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida, TEA es trietilamina, DIPEA es diisopropiletilamina, HOBt es *N*-hidroxibenzotriazol o *hidrato de N*-hidroxi-benzotriazol, y T3P es anhídrido propilfosfónico.

### Ejemplos

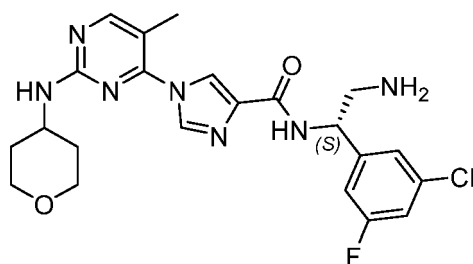
- 25 Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera seca de nitrógeno y/o argón a menos que se especifique lo contrario. A menos que se indique lo contrario, todas las materias primas, disolventes y reactivos se adquirieron de fuentes comerciales (por ejemplo, Avocado Research Chemicals, Apollo Scientific Limited, Bepharma Ltd., Combi-Blocks Inc., Sigma Aldrich Chemicals Pvt. Ltd., Ultra Labs, Toronto Research Chemicals Inc., Chemical House, RFCL Limited, Spectro Chem Pvt. Ltd., Leonid Chemicals, Loba Chemie, Changzhou Yangyuan, NeoSynth., Rankem, etc.) y se utilizaron como tales sin purificación adicional o los reactivos pueden sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Normalmente, el progreso de cada reacción se controló por análisis TLC.

- 35 Se utilizaron comúnmente los sistemas de purificación flash automatizados Biotage Isolera® One y CombiFlash® (Teledyne Isco) para la purificación de productos en bruto, utilizando la combinación de eluyentes mencionada en los correspondientes procedimientos. La cromatografía flash se realizó con gel de sílice (malla 60-100, 100-200 y 230-400) de Chemlabs, con nitrógeno y/o aire comprimido para permitir el flujo de eluyente presurizado. La cromatografía en capa fina preparativa (TLC preparativa) se llevó a cabo usando gel de sílice (placas puntuadas previamente GF 1500 μM 20 x 20 cm y GF 2000 μM 20 x 20 cm de Analtech, Inc. Delaware, EE. UU.). La cromatografía analítica en capa fina (TLC) se llevó a cabo usando láminas de gel de sílice recubiertas previamente (Merck 60 F<sub>254</sub>). La detección visual se realizó con luz ultravioleta, tinción con *p*-anisaldehído, tinción con ninhidrina, tinción con dinitrofenilhidrazina, tinción con permanganato de potasio o yodo. Las reacciones a temperatura más baja se realizaron utilizando baños fríos, por ejemplo, H<sub>2</sub>O/hielo a 0 °C y acetona/hielo seco a -78 °C. Las reacciones en condiciones de microondas se realizaron en un horno de microondas CEM Discover SP 909155. Los puntos de fusión se determinaron usando un aparato de intervalo de fusión visual LabIndia MR-VIS. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se registraron a 400 MHz con un espectrómetro Varian V400, Bruker 400 (a menos que se indique lo contrario) a temperatura ambiente, utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico se expresan en δ (partes por millón). Los espectros de masas de todos los compuestos intermedios y finales se registraron utilizando Acquity® UPLC-SQD (aguas) y Agilent 1290 Infinity® UHPLC con máquinas 6150 SQD. Los espectros de HPLC se registraron utilizando sistemas Agilent 1290 Infinity® UHPLC y Alliance (Waters). Los espectros de LCMS se registraron utilizando Agilent 1200® LCMS, Agilent 1290® UHPLC-SQD con detector de matriz de diodos (DAD), instrumentos de detección por LC-MS que utilizan una columna BEH C18 y una columna HD C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 μm) y (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm) de Zorbax®, una fase móvil de ácido fórmico al 0,01 % y acetonitrilo o 0,01 % de ácido trifluoroacético y acetonitrilo, y un caudal de 0,3 ml/min, una temperatura de columna de 70 o 50 °C y un tiempo de ejecución de 3 a 5 min. La pureza de cada uno de los compuestos finales se determinó utilizando Waters® PDA con SQD y Agilent® DAD con instrumentos 6150 SQD y las siguientes condiciones:

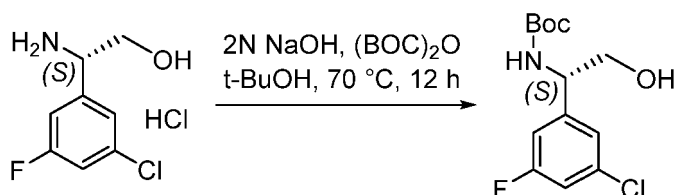
- 60 Condición 1: Columna: BEH C18 (Waters); fase móvil: ácido acético al 0,01 % con acetonitrilo y ácido acético al 0,01 % con metanol; gradiente: (B/%T): 0/0, 1,2/100, 2,5/100, 2,8/0, 3,0/0; flujo: 0,3 ml/min; temperatura: 70 °C; tiempo de ejecución: 3,0 min.

Condición 2: Columna: Zorbax® HD C18; fase móvil: ácido acético al 0,01 % con acetonitrilo y ácido acético al 0,01 % con metanol; gradiente: (B/%T): 0/0, 2,5/100, 4,5/100, 4,8/0, 5,0/0; flujo: 0,3 ml/min; temperatura: 50 °C; tiempo de ejecución: 5,0 min

- 65 **Ejemplo 24: (S)-N-(2-Amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (Compuesto número 275)**

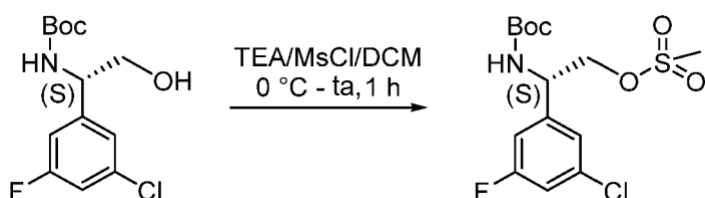


5 **Etap 1: (1-(3-Cloro-5-fluorofenil)-2-hidroxietyl)carbamato de (S)-terc-butilo**



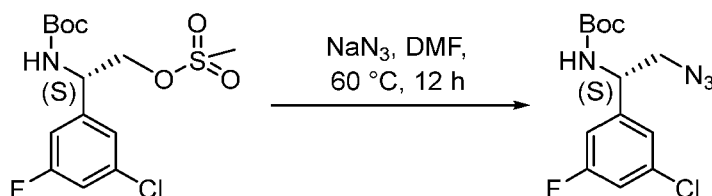
10 A una solución agitada de clorhidrato de (S)-2-amino-2-(3-cloro-5-fluorofenil)etanol (10 g, 44,44 mmol) en *t*-butanol (100 ml) se añadió NaOH 2N (2,22 g, 55,55 mmol, en 111 ml de agua) y dicarbonato de di-*terc*-butilo (13,56 g, 62,22 mmol). La mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 12 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Después, la reacción se desactivó con agua (2 x 100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (30 ml), seguido de salmuera (30 ml), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar 13 g de producto en bruto. El producto en bruto se combinó con dos lotes de productos en bruto adicionales que se prepararon de manera similar, y el material combinado se purificó mediante cromatografía en columna de gradiente utilizando acetato de etilo en *n*-hexano como eluyente para producir (1-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-hidroxietyl)carbamato de (S)-*terc*-butilo como un sólido blanquecino (94 % de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,26-7,23 (m, 2H), 7,20 (s, 1H), 7,11 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 4,83 (t, *J* = 4 Hz, 1H), 4,52-4,50 (m, 1H), 3,50-3,43 (m, 2H), 1,34 (s, 9H). Masa exacta calculada por LCMS 289,74, *m/z* encontrada 190,0 [M+H-Boc]<sup>+</sup>.

20 **Etap 2: (S)-2-((terc-Butoxicarbonil)amino)-2-(3-cloro-5-fluorofenil)etilmetanosulfonato**



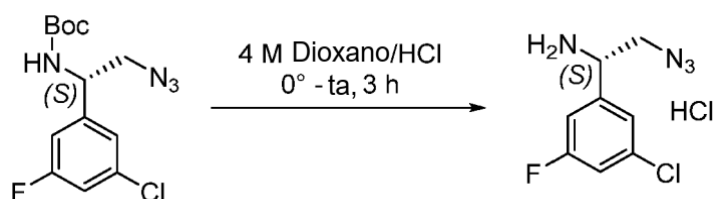
25 A una solución agitada de (1-(3-cloro-5-fluorofenil)-2-hidroxietyl)carbamato de (S)-*terc*-butilo (12 g, 41,52 mmol) en diclorometano (100 ml) a 0 °C, se añadió trietilamina (6,93 ml, 49,83 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 min a 0 °C. Después se añadió cloruro de metanosulfonilo (3,73 ml, 45,674 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El progreso de la reacción se controló por TLC. La reacción se inactivó con agua (100 ml) y se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de amonio (100 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida para producir metanosulfonato de (S)-2-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-cloro-5-fluorofenil)etilo (15,25 g) como un sólido de color amarillo claro, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,68 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,29 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 4,28-4,19 (m, 2H), 3,15 (s, 3H), 1,36 (s, 9H). Masa exacta calculada por LC-MS 367,07, *m/z* encontrada 268,0 [M+H-Boc]<sup>+</sup>.

35 **Etap 3: (2-Azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)carbamato de (S)-terc-butilo**



5 A una solución agitada de metanosulfonato de (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-(3-cloro-5-fluorofenil)etilo (15,25 g, 41,55 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) a temperatura ambiente se añadió azida de sodio (5,4 g, 83,11 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 12 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC, después, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml) seguido de salmuera (100 ml) y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto en bruto se combinó con dos lotes de productos en bruto adicionales que se prepararon de manera similar, y el material combinado se purificó mediante cromatografía en columna de gradiente utilizando acetato de etilo en n-hexano como eluyente para producir (2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)carbamato de (S)-*tert*-butilo como un sólido blanquecino (83 % de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7,66 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,31 (s a, 2H), 7,21 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 4,77-4,75 (m, 1H), 4,44 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 1,36 (s, 9H). Masa exacta calculada por LC-MS 314,09, m/z encontrada 259 [M+H-tBu]<sup>+</sup>.

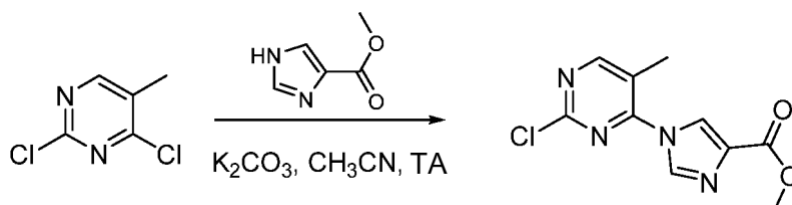
15 **Etapla 4: Clorhidrato de (S)-2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etanamina**



20 A una solución agitada de (2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)carbamato de (S)-*tert*-butilo (10 g, 31,85 mmol) en 1,4-dioxano (100 ml) se añadió gota a gota HCl 4 M en 1,4-dioxano (100 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El exceso de disolvente se evaporó a presión reducida para obtener un residuo sólido. El sólido se lavó con pentano (2 x 50 ml) y se secó para producir clorhidrato de (S)-2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil) etanamina (7,87 g, 98,8 %) como un sólido blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,94 (s a, 3H), 7,56 (s, 1H), 7,49 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 4,55 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 3,92 - 3,81 (m, 2H). Masa exacta calculada por LC-MS 214,04, m/z encontrada 215,1 [M+H]<sup>+</sup>.

25

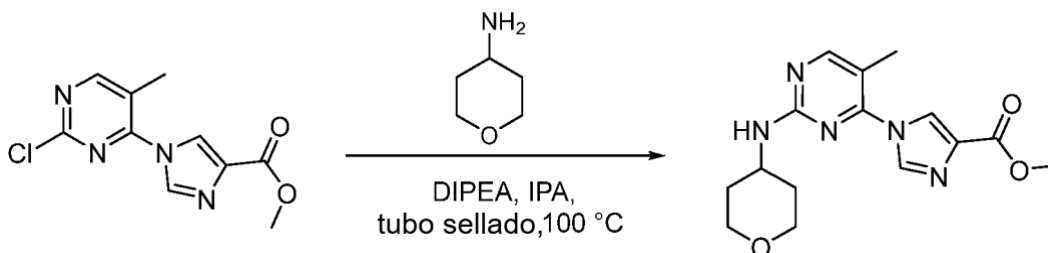
**Etapla 5a: 1-(2-Cloro-5-metilpirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxilato de metilo**



30 A una solución agitada de 1-*H*-imidazol-4-carboxilato de metilo (2,32 g, 18,4 mmol) en acetonitrilo (75 ml) se añadió carbonato de potasio (5,08 g, 36,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min, después se añadió 2,4-dicloro-5-metilpirimidina (2 g, 18,4 mmol). Se agitó la mezcla resultante a TA durante la noche. La mezcla se inactivó con agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gradiente usando acetato de etilo en n-hexano como eluyente para producir 1-(2-cloro-5-metilpirimidin-4-il)-1-*H*-imidazol-4-carboxilato de metilo como un sólido blanquecino (53,7 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,63 (s, 1H), 8,25 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 3,95 (s, 3H), 2,52 (s, 3H). Masa exacta calculada por LC-MS 252,04, m/z encontrada 253,1 [M+H]<sup>+</sup>.

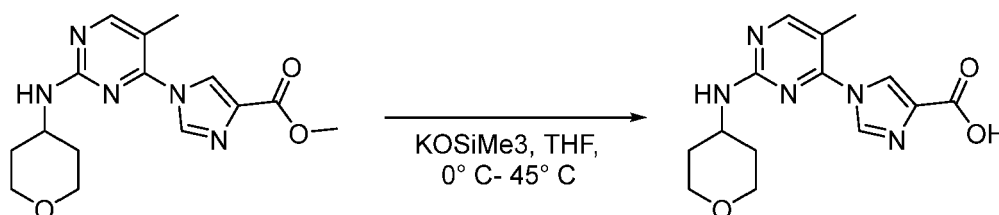
35

40 **Etapla 5b: 1-(5-Metil-2-((tetrahidro-2H)-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H imidazol-4-carboxilato de metilo**



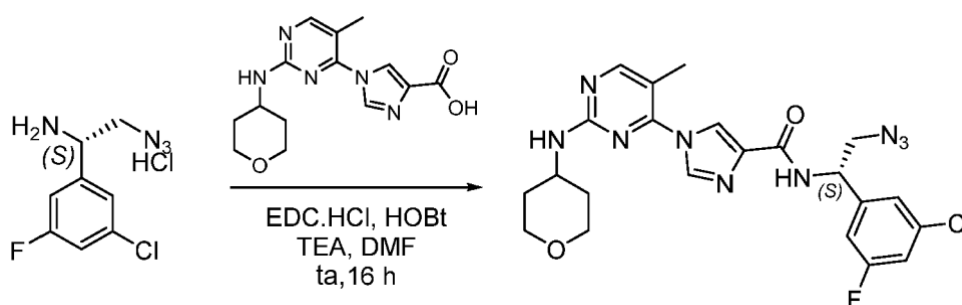
A una solución de 1-(2-cloro-5-metilpirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxilato (0,27 g, 1,07 mmol) en isopropanol (5 ml) se añadió DIPEA (0,58 ml, 3,21 mmol) y tetrahidro-2*H*-piran-4-amina (0,16 ml, 1,60 mmol). La mezcla resultante se agitó en un tubo de vidrio sellado a 100 °C durante 20 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a presión reducida. El resto se purificó mediante cromatografía en columna de gradiente utilizando metanol en DCM como eluyente para producir 1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxilato de metilo como un sólido blanquecino (0,25 g, 76 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,35 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,38 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,85-3,82 (m, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,37 (t, *J* = 10 Hz, 2H), 2,15 (s, 3H), 1,80 (d, *J* = 10,4 Hz, 2H), 1,50-1,46 (m, 2H). Masa exacta calculada por LC-MS 317,15, *m/z* encontrada 318,4 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Etapa 5c: Ácido 1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxílico

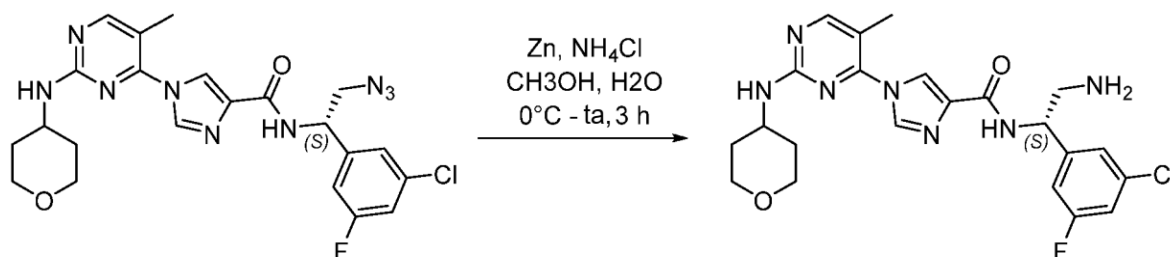


A una solución agitada de 1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxilato de metilo (1,5 g, 4,731 mmol) en tetrahydrofurano (30 ml) se añadió trimetilsilanolato de potasio (1,82 g, 14,18 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 45 °C durante 1,5 h. Después, la mezcla de reacción se inactivó con agua (25 ml) y se lavó con acetato de etilo (2 x 10 ml). La capa acuosa se ajustó a pH ~5-6 mediante la adición de una solución de HCl 4N. La capa acuosa se extrajo después con acetato de etilo (3 x 60 ml) y las capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida, para producir ácido 1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxílico, en forma de un sólido de color blanquecino, (1,2 g, 84 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12,47 (s a, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,23 (s a, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,36 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,88 (s a, 1H), 3,83 (d, *J* = 11,6 Hz, 2H), 3,36 (t, *J* = 10,8 Hz, 2H), 2,15 (s, 3H), 1,80 (d, *J* = 10,4 Hz, 2H), 1,52 - 1,42 (m, 2H). Masa exacta calculada por LC-MS 303,13, *m/z* encontrada 304,4 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Etapa 5d: (S)-*N*-(2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxamida



A una solución agitada de ácido 1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxílico (12,2 g, 40,26 mmol) en *N,N'*-dimetilformamida (120 ml) se añadió trietilamina (16,8 ml, 120,79 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (15,44 g, 80,53 mmol), hidroxibenzotriazol (3,08 g, 20,13 mmol) y Clorhidrato de (S)-2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etanamina (8,01 g, 32,21 mmol) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción se controló por TLC (metanol al 8 % en diclorometano). La mezcla de reacción se diluyó con agua (2 X 100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de amonio (1 x 200 ml), seguida de solución saturada de bicarbonato de sodio (1 x 200 ml) y salmuera (1 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir el producto en bruto. El producto en bruto se combinó con dos lotes de productos en bruto adicionales que se prepararon de manera similar, y el material combinado se purificó mediante cromatografía en columna de gradiente usando metanol en diclorometano como eluyente para producir (S)-*N*-(2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1*H*-imidazol-4-carboxamida (69 %) como un sólido blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,90 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,34-7,31 (m, 3H), 5,29-5,23 (m, 1H), 3,86 (s a, 1H), 3,85-3,84 (m, 3H), 3,66-3,62 (m, 1H), 3,36 (t, *J* = 10,8 Hz, 2H), 2,17 (s, 3H), 1,80 (d, *J* = 10,8 Hz, 2H), 1,51 - 1,44 (m, 2H). Masa exacta calculada por LCMS 499,16, *m/z* encontrada 500,1 [M+H]<sup>+</sup>.

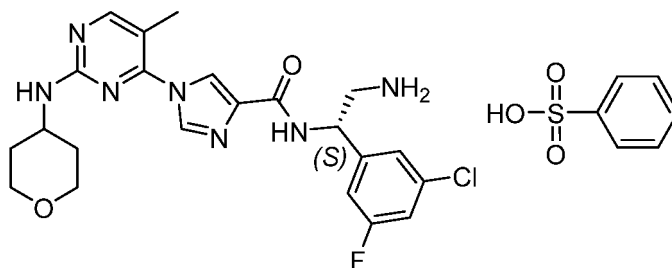
**Etapa 6: (S)-N-(2-Amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida**

5

A una solución agitada de (S)-N-(2-azido-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (9,0 g, 18,04 mmol) en metanol (100 ml) se añadió polvo de zinc (5,89 g, 90,18 mmol), seguido de cloruro de amonio (4,823 g, 90,18 mmol) en agua (20 ml) a 0 °C, a continuación la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El progreso de la reacción se controló por TLC (8 % de metanol en diclorometano). La mezcla de reacción se inactivó con solución saturada de bicarbonato de sodio (100 ml) y metanol (100 ml), después se filtró a través de celite, lavando con metanol. El filtrado se evaporó y se diluyó con 50 ml de bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron para producir el producto en bruto. El producto en bruto se combinó con dos lotes de productos en bruto adicionales que se prepararon de manera similar, y el material combinado se purificó mediante cromatografía en columna de gradiente utilizando metanol en diclorometano con isopropilamina al 0,1 % como eluyente, para producir (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (18,5 g, 55 %) como un sólido blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,58 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,35 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,28-7,25 (m, 2H), 7,19 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 4,93-4,90 (m, 1H), 3,90 (s a, 1H), 3,83 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 3,36 (t, J = 10,8 Hz, 2H), 2,95-2,95 (m, 1H), 2,91-2,88 (m, 1H), 2,17 (s, 3H), 1,98-1,9 (s a, 2H), 1,80 (d, J = 12 Hz, 2H), 1,50-1,46 (m, 2H). Masa exacta calculada por LCMS 473,17, m/z encontrada 474,2 [M+H]<sup>+</sup>. Pureza por HPLC: 99,79 %, Pureza por HPLC quiral: 99,92 %.

**Ejemplo 30: Sal de ácido benenosulfónico de (S)-N-(2-Amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (Compuesto número 302)**

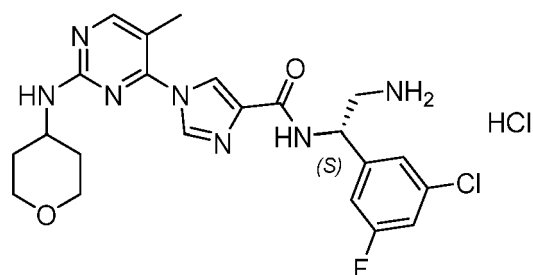
25



A una solución agitada de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (0,2 g, 0,422 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) se añadió lentamente ácido benenosulfónico (0,066 g, 0,422 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó, se lavó con éter dietílico y se secó para proporcionar sal de ácido benenosulfónico de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida como un sólido blanquecino (0,22 g, 83 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,92 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,83 (s a, 3H), 7,57 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 7,37 (s, 3H), 7,28 (d, J = 6,4 Hz, 4H), 5,32 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 3,83 (d, J = 11,6 Hz, 3H), 3,41-3,27 (m, 3H), 3,18-3,14 (m, 1H), 2,16 (s, 3H), 1,80 (d, J = 12 Hz, 2H), 1,52 - 1,44 (m, 2H). Masa exacta calculada por LC-MS 473,17, m/z encontrada 474,2 [M+H]<sup>+</sup>. Pureza por HPLC 99,85 %, Punto de fusión: 161-162 °C.

**Ejemplo 33: Sal clorhidrato de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (Compuesto número 305)**

40



5 A una solución agitada de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida (0,05 g, 0,105 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml) se añadió lentamente HCl 4 M en dioxano (0,02 ml, 0,105 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1,0 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó, se lavó con éter dietílico y se secó para proporcionar sal clorhidrato de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida como un sólido blanquecino (0,05 g, 94 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8,95 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,00 (s a, 3H), 7,37 (s a, 3H), 7,28 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 5,33 (t, 1H), 3,85-3,82 (m, 3H), 3,37-3,33 (m, 3H), 3,25 (t, 1H), 2,16 (s, 3H), 1,80 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 1,52 - 1,44 (m, 2H). Masa exacta calculada por LC-MS 473,17, m/z encontrada 474,2 para [M+H]<sup>+</sup>. Pureza por HPLC 99,86 %, Punto de fusión: 210 - 211 °C.

15 La siguiente **tabla 1** proporciona datos obtenidos y utilizados en la caracterización de los compuestos preparados.

Tabla 1

N.º de compuesto	Estructura	Nombre	Datos de RMN
236		N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,57 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,34 (s a, 1H), 7,27 (s a, 1H), 7,18 (d, J = 10 Hz, 1H), 4,91 (s, 1H), 3,84-3,81 (m, 3H), 3,38-3,27 (m, 2H), 2,93 (s, 1H), 2,87 (s, 1H), 2,30 (s, 3H), 1,83-1,78 (m, 2H), 1,49 (s a, 2H)
275		(S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,72 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,35 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,27-7,24 (m, 2H), 7,17 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,0 (s a, 1H), 5,15-5,05 (m, 1H), 3,95 - 3,81 (m, 3H), 3,38 - 3,35 (m, 4H), 2,16 (s, 3H), 1,81-1,78 (m, 2H), 1,51 -1,41 (m, 2H), 1,30 (s, 9H).
276		(R)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,72 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,35 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,27-7,24 (m, 2H), 7,17 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,0 (s a, 1H), 5,15-5,05 (m, 1H), 3,95 - 3,81 (m, 3H), 3,38 - 3,35 (m, 4H), 2,16 (s, 3H), 1,81-1,78 (m, 2H), 1,51 -1,41 (m, 2H), 1,30 (s, 9H).

(continuación)

N.º de compuesto	Estructura	Nombre	Datos de RMN
302		Sal de ácido benzenosulfónico de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,92 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,83 (s a, 3H), 7,57 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 7,37 (s, 3H), 7,28 (d, J = 6,4 Hz, 4H), 5,32 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 3,83 (d, J = 11,6 Hz, 3H), 3,41-3,27 (m, 3H), 3,18-3,14 (m, 1H), 2,16 (s, 3H), 1,80 (d, J = 12 Hz, 2H), 1,52 - 1,44 (m, 2H).
305		Sal clorhidrato de (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)-pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ 8,95 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,00 (s a, 3H), 7,37 (s a, 3H), 7,28 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 5,34 - 5,31 (m, 1H), 3,85 - 3,82 (m, 3H), 3,37-3,33 (m, 3H), 3,26-3,23 (m, 1H), 2,16 (s, 3H), 1,80 (d, J = 11,6 Hz, 2H), 1,52-1,44 (m, 2H)

**Ejemplo 34. ENSAYOS BIOLÓGICOS****5 Ensayos (bioquímicos) de HTRF de ERK1 y ERK2**

Estos ensayos emplearon una técnica de fluorescencia homogénea resuelta en tiempo (HTRF). Los compuestos se diluyeron en serie en forma semilogarítmica con concentraciones que oscilaban entre 0,0005 y 10 μM en el tampón de ensayo (Tris 50 mM pH=7,5, EGTA 1 mM, DTT 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Tween-20 al 0,1 %) y 20 μl de mezcla de sustrato-ATP [biotina 1 μM - LC - péptido derivado de proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés) (Anaspec)-ATP 24 μM (Sigma)] a cada pocillo de la placa de ensayo. A continuación, se añadieron a cada pocillo 10 μl de mezcla de enzimas [ERK1 o ERK2 (Jubilant Biosys) 25 nM en tampón de ensayo]. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 60 min con agitación. Se preparó la mezcla de HTRF [LANCE<sup>®</sup> Ultra europio-anti-fosfo-MBP 625 nM (Perkin Elmer) y Phycollink<sup>®</sup> Estreptavidina-Alofococianina (SA-APC) (Prozyme) 2 nM en tampón HTRF (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, NaCl 100 mM, BSA al 0,1 %, Tween20 al 0,05 %, EDTA 0,5 mM)] y se añadieron 75 μl de esta mezcla a la placa de HTRF. Después de incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente, se transfirieron 10 μl de la mezcla de reacción a la placa de ensayo de HTRF e se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación. La placa se leyó usando Pherastar en modo HTRF (excitación 337 nm, emisión 665 y 620 nm). Los valores de CI<sub>50</sub> (la mitad de los valores de concentración inhibitoria máxima) se determinaron posteriormente utilizando una curva dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) en el programa informático GraphPad Prism<sup>®</sup> 5. Los compuestos de la invención provocaron la inhibición de ERK1 y ERK2 según se determinó en estos ensayos. Los datos representativos se proporcionan en la **tabla 2**.

**25 Ensayo de proliferación celular (Alamar Blue)**

Se sembraron células HT-29 (carcinoma colorrectal, B-RafV600E), HCT116 (carcinoma colorrectal, K Ras G13D), A375 (melanoma, B-RafV600E) y SK-Mel2 (melanoma, NRAS Q61R) (obtenidas de la ATCC, Estados Unidos) (5000 células/pocillo) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante 16-24 horas. A continuación, las células se trataron con compuestos, a concentraciones normalmente de 0,0005 a 10 μM preparadas en diluciones en serie de 3 veces. A continuación, las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % en un ambiente húmedo. Después se añadió el reactivo Alamar Blue<sup>™</sup> (concentración final IX) a cada pocillo y se incubó durante 1-3 h a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Las placas se leyeron en un lector de fluorescencia a longitudes de onda de excitación de 540 nm y de emisión de 590 nm. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron posteriormente usando una curva dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) usando el programa informático GraphPad Prism<sup>®</sup> 5. Los compuestos de la invención provocaron la inhibición de la proliferación de las células HT-29, HCT116, A375 y SK-Mel2 según se determina en estos ensayos. Los datos representativos de los ensayos de proliferación de células HT-29 y HCT116 se proporcionan en la **tabla 2**.

**40 Ensayo ELISA de fosfo-RSK1(S380)**

Se sembraron (60.000 células/pocillo) células HT-29 (carcinoma colorrectal, B-RafV600E); obtenidas de la ATCC, Estados Unidos) en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche y luego se trataron

con las diluciones del compuesto deseado durante 2 h. Se eliminó el medio y las células se enjuagaron una vez con IX PBS enfriado con hielo, después se añadieron a cada pocillo 0,070 ml de tampón de lisis celular IX enfriado con hielo que contenía PMSF 1 mM y la placa se incubó en un agitador durante 2 h y 30 min a 4 °C. A continuación, la placa se centrifugó durante 20 min (x4000 rpm) a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a una nueva placa. Los lisados celulares se diluyeron con diluyente de muestra en una relación 1:1. A continuación se realizó el ELISA siguiendo el protocolo del fabricante (Kit ELISA tipo sándwich PathScan® fosfo-RSK1(Ser380), Cell Signaling Technologies). La placa se leyó a 450 nm en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución STOP. Los valores de  $CI_{50}$  se determinaron posteriormente utilizando una curva dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable) en el programa informático GraphPad Prism® 5. Los compuestos de la invención inhibieron la fosforilación de RSK1(S380) (la diana cadena abajo de ERK1/2) según se determinó en este ensayo. Los datos representativos se proporcionan en la **tabla 2**.

### **Estudios *in vivo* en modelos de xenoinjertos tumorales**

#### **15 Implantación de células tumorales y aleatorización de animales**

Se utilizó la cepa Foxn1 nu/nu de ratones hembra (obtenida de Charles River Laboratories, Estados Unidos), de 8-10 semanas de edad, intervalo de peso corporal 23-25 g para los estudios de eficacia de xenoinjertos tumorales. En primer lugar se cultivaron líneas celulares de cáncer humanas (como A375 de melanoma, HT29 colorrectales, BxPC3 pancreáticas, HCT116 colorrectales y A549 de pulmón) *in vitro*, y después aproximadamente cinco millones ( $5 \times 10^6$ ) de estas células en 100  $\mu$ l de medio sin suero se mezclaron con una cantidad igual de matrigel, y la mezcla completa se inyectó por vía subcutánea en la región del flanco derecho de los ratones. Los tumores se midieron periódicamente con calibres Vernier después de la primera semana de la inyección. Cuando el volumen tumoral alcanzó 120-150 mm<sup>3</sup> (aproximadamente 3-4 semanas después de la inyección) los animales se aleatorizaron en diferentes grupos para que el volumen tumoral fuera aproximadamente el mismo en todos los grupos.

#### **Determinación de la eficacia de la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo***

Para la dosificación PO, los compuestos se prepararon en una formulación que contenía metilcelulosa al 0,5 % y Tween 80 al 0,01 %. Para la dosificación IV, SC o IP, los compuestos se prepararon en soluto al 6 % - etanol (1:1), DMSO al 6 % y solución salina al 88 %. Los animales recibieron la dosis con compuestos preparados en formulaciones específicas a través de vía PO, IP o SC ya sea QD o BID en las dosis requeridas. El tamaño de los tumores y los pesos corporales se midieron dos o tres veces en una semana. Los tumores se recogieron al final del estudio después de sacrificar a los animales según protocolos aprobados. Una parte del tumor extraído se congeló instantáneamente y se sometió a estudios farmacocinéticos, y la otra parte se homogeneizó y los lisados se analizaron para determinar la inhibición de la diana mediante transferencia Western. Antes de extraer el tumor, se recogió sangre (~200  $\mu$ l) mediante sangrado ocular para realizar estudios farmacocinéticos.

Los cambios en el volumen tumoral ( $\Delta$  volúmenes) para cada grupo tratado (T) y de control (C) se calcularon restando el volumen tumoral medio en el primer día de tratamiento (día de inicio) del volumen tumoral medio el día de observación especificado. Estos valores se usaron para calcular un porcentaje de crecimiento (% T/C) usando la fórmula:

$$\% T/C = (\Delta T/\Delta C) \times 100,$$

donde  $\Delta T > 0$ , o

$$\% T/C = (\Delta T/\Delta T_i) \times 100,$$

donde  $\Delta T < 0$  y  $T_i$  es el volumen tumoral medio al comienzo del experimento. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral se calculó como  $[100 - \% T/C]$ . El cambio de peso corporal porcentual se calculó como  $[(\text{Peso corporal en el día de observación especificado} - \text{Peso corporal en el día de inicio}) / \text{Peso corporal en el día de inicio}] \times 100$ .

### **Resultados**

Los compuestos de la invención fueron activos en estos estudios de xenoinjertos tumorales *in vivo*.

En un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano (HCT116; portadoras de la mutación KRAS), el compuesto del ejemplo 275 provocó una inhibición del crecimiento tumoral de aproximadamente un 90-100 % cuando se administró por vía oral a 50 mg/kg dos veces al día durante 24 días. No se observó una pérdida significativa de peso corporal con esta dosis en este estudio.

En un modelo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón humano (A549; portadoras de la mutación KRAS), el compuesto del ejemplo 302 provocó una inhibición del crecimiento tumoral de aproximadamente un 65 a un 82 % cuando se administró por vía oral a 50 mg/kg dos veces al día durante 20 días. No se observó una pérdida significativa de peso corporal con esta dosis en este estudio.

Tabla 2: Resultados de ensayos basados en células bioquímicos, mecanicistas y de proliferación

N.º de compuesto	Ensayo bioquímico <sup>1</sup>		Ensayo celular mecanicista <sup>2</sup>	Ensayo de proliferación celular <sup>2</sup>	
	ERK1	ERK2	RSK1 Phos HT29	HT29	HCT116
236	A	A	A	A	A
275	A	A	A	A	A
276	A	A	B	C	D
302	A	A	ND	ND	ND
305	A	A	ND	ND	ND

<sup>1</sup>Ensayo bioquímico: Valores de CI<sub>50</sub>; **A:** ≤ 50 nM, **B:** >50 a 100 nM, **C:** >100 a 500 nM, **D:** >500 nM a 2,5 μM, **E:** >2,5 μM, **ND:** Dato no disponible  
<sup>2</sup>Ensayo celular mecanicista y ensayos de proliferación celular: Valores de CI<sub>50</sub>; **A:** ≤ 100 nM, **B:** >100-250 nM, **C:** >250-500 nM, **D:** >500 nM-2,5 μM, **E:** >2,5 μM; **ND:** Dato no disponible.

En una realización, el compuesto de la invención es:

- 5 (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida;  
o una sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 10 En una realización, el compuesto es un estereoisómero sustancialmente puro.

En una realización, una composición de la invención comprende:

- 15 (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida;  
o una sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición comprende además un agente terapéutico adicional.

- 20 También se describe en el presente documento un método para tratar una afección que se puede tratar mediante la inhibición de ERK1/2 que comprende la administración a un individuo que lo necesita de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de la invención para al menos retrasar la progresión de la afección.

- 25 La afección puede ser cáncer de próstata, cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, bronquio, laringe, faringe, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, vejiga, útero, cuello uterino, mama, ovarios, vagina, testículos, piel, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, intestinos, páncreas, cerebro, sistema nervioso central, glándula suprarrenal, piel o una leucemia o linfoma.

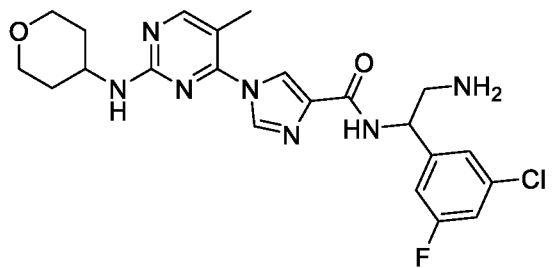
- 30 El método puede comprender la administración a un individuo que lo necesite de una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- 35 (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida;  
o una sal, solvato, hidrato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de la misma.

## REIVINDICACIONES

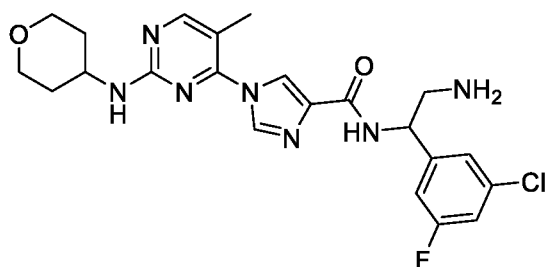
1. Un compuesto que es N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:

5



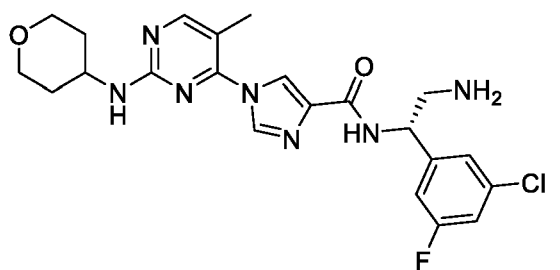
o una sal, un solvato, un hidrato o un estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



15 o una sal o un estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:

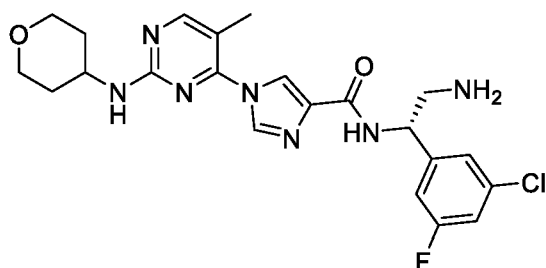


20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

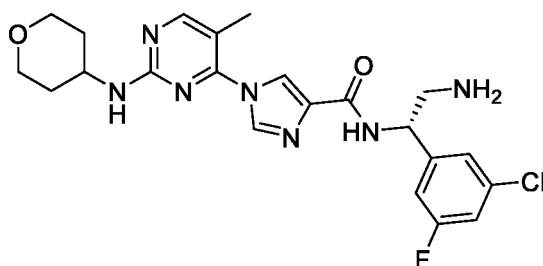
25 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la sal es una sal de un ácido seleccionado de acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, trifluoroacético y canforsulfónico.

30 5. El compuesto de la reivindicación 3, en donde el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahydro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



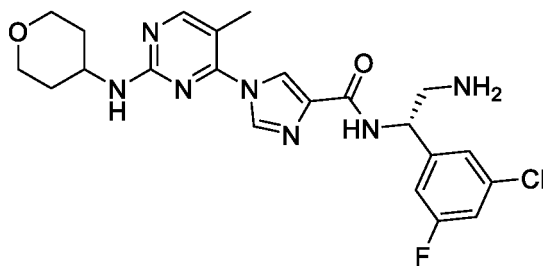
5

6. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



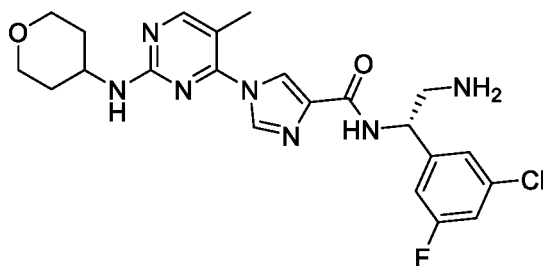
sal de ácido benenosulfónico.

10 7. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



15 sal clorhidrato.

8. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto es (S)-N-(2-amino-1-(3-cloro-5-fluorofenil)etil)-1-(5-metil-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)pirimidin-4-il)-1H-imidazol-4-carboxamida:



20

sal de ácido mandélico.

25 9. Una composición que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método de tratamiento de una afección que se puede tratar mediante la inhibición de ERK1/2.

30 11. El compuesto para su uso según la reivindicación 10, en donde la afección está asociada a una proliferación celular anormal.

12. El compuesto para su uso según la reivindicación 10, en donde la afección es cáncer de próstata, cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, bronquio, laringe, faringe, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, vejiga, útero, cuello uterino, mama, ovarios, vagina, testículos, piel, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, intestinos, páncreas, cerebro, sistema nervioso central, glándula suprarrenal, piel o una leucemia o linfoma.
- 5
13. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el método comprende la administración semanalmente del compuesto.
- 10
14. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el método comprende la administración mensualmente del compuesto.
15. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el método comprende la administración de dosis equivalentes del compuesto aproximadamente cada semana.
- 15
16. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el método comprende la administración de dosis equivalentes del compuesto aproximadamente cada dos semanas.