

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 741**

51 Int. Cl.:

A61K 31/357 (2006.01) **C07D 405/14** (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)
A61K 31/5685 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2017** **PCT/US2017/046098**
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018** **WO18031658**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2017** **E 17840210 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023** **EP 3496721**

54 Título: **Tratamiento del carcinoma de células de Merkel**

30 Prioridad:

10.08.2016 US 201662373263 P
08.03.2017 US 201762468424 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.06.2024

73 Titular/es:

CELGENE QUANTICEL RESEARCH, INC.
(100.0%)
9393 Town Centre Drive, Suite 110
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es:

XU, JIANGCHUN;
CHO, ROBERT y
NGUYEN, AARON

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 972 741 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

Tratamiento del carcinoma de células de Merkel

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º62/373.263, presentada el 10 de agosto de 2016 y de la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º62/468.424, presentada el 8 de marzo de 2017.

10 Campo

Las realizaciones descritas en el presente documento proporcionan composiciones y formulaciones para su uso en el tratamiento del cáncer y enfermedades neoplásicas, que comprende la administración de un inhibidor de desmetilasa-1 específica de lisina (LSD-1, por las siglas del inglés *lysine specific demethylase-1*) como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

Sigue existiendo la necesidad de composiciones, formulaciones y métodos para tratar sujetos con cánceres tales como, por ejemplo, carcinoma basocelular, linfomas no hodgkinianos (LNH) recidivantes o resistentes, glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico u otros tumores sólidos avanzados.

Por ejemplo, el carcinoma basocelular (CBC) es un cáncer común en todo el mundo, y su incidencia va en aumento. Solo en Estados Unidos, más de 3,5 millones de nuevos pacientes se diagnostican cada año con cáncer de piel distinto del melanoma. La mayoría de los CBC se pueden curar con terapia tópica, cirugía, radioterapia o una combinación de las mismas. El CBC avanzado, sin embargo, suele provocar desfiguración y morbilidad significativas con secuelas físicas y psicológicas asociadas, ya que el CBC comúnmente se produce en zonas expuestas al sol, tales como el rostro. Por otra parte, una pequeña proporción de estos cánceres son metastásicos y no son susceptibles a la terapia habitual. Casi todos los CBC se asocian con la señalización aberrante de la proteína erizo (Hh, *Hedgehog*), que estimula el crecimiento celular no regulado, y varios inhibidores terapéuticos de Hh han demostrado ser útiles en el tratamiento del CBC. Desafortunadamente, aproximadamente el 20 % de los CBC desarrollan resistencia a los inhibidores actuales de Hh, generalmente a través de la reactivación de la vía Hh mediante mutaciones que interfieren con el bolsillo de unión al fármaco, aumentan la actividad de señalización de Hh o actúan a través de cambios en el número de copias concomitantes en los genes supresores. Los pacientes se beneficiarán del desarrollo de agentes bien tolerados que superen estas vías de resistencia, por ejemplo, dirigiéndose a proteínas en dirección 3' en las vías de señalización pertinentes. Los documentos US 2015315187 A1 y US 2014155339 A1 se refieren a inhibidores de LSD-1 conocidos.

40 Breve resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Las referencias a métodos de tratamiento en la presente descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Descripción de los dibujos

Las figuras que no contienen el compuesto actualmente reivindicado para su uso relacionado con el tratamiento actualmente reivindicado son figuras de referencia.

La Figura 1 muestra el efecto del Compuesto A sobre la expresión del ácido ribonucleico mensajero del péptido liberador de gastrina en NCI-H1417, NCI-H209 y NCI-H69. DMSO = dimetilsulfóxido; PLG = péptido liberador de gastrina; CI_{50} = concentración inhibidora semimáxima; ARNm = ácido ribonucleico mensajero; ARN = Ácido ribonucleico. Los datos se presentan como el porcentaje de actividad medio de tres experimentos independientes para NCI-H1417 y NCI-H209 y de dos experimentos independientes para NCI-H69, y las barras de error representan la desviación estándar.

La Figura 2 muestra la inmunoprecipitación de cromatina y el análisis de secuenciación de la unión de la desmetilasa 1 específica de lisina al ácido desoxirribonucleico de células NCI-H69 y NCI-H209. Cro = cromosoma; PLG = péptido liberador de gastrina; H3K4me1 = monometil histona H3 lisina 4; LSD1 = desmetilasa 1 específica de lisina; CPM = cáncer de pulmón microcítico; Los resultados de dos anticuerpos LSD1 (anticuerpo anti-KDM1/LSD1 [abcam®, Cambridge, MA Cat N.º ab17721] y anticuerpo anti-BHC110/LSD1 [Bethyl Laboratories, Montgomery, TX Cat N.º A300-215A]) y el anticuerpo H3K4me1 (abeam®, Cambridge, MA Cat N.º ab8895), se muestran en el rastro del navegador como lecturas normalizadas por millón. Las barras negras debajo de cada rastro indican regiones enriquecidas sobre el fondo (es decir, unidas). Los óvalos rojos indican regiones reguladoras ocupadas conjuntamente por LSD1 y H3K4me1. Se muestra la posición del gen PLG en el cromosoma

18 humano. Los cuadros indican los exones conectados por líneas con flechas que indican la dirección de la transcripción con el primer exón de la izquierda. Los genes adyacentes a PLG se muestran en gris. Se muestran las lecturas del control de entrada de cada línea celular (Fondo).

La Figura 3 muestra el efecto del Compuesto A sobre la expresión del ácido ribonucleico mensajero del péptido liberador de gastrina humana en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón microcítico NCI-H1417. ANOVA = análisis de varianza; ns = no estadísticamente significativo. El gráfico muestra los valores individuales de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculados como se describe, con líneas horizontales en la media \pm desviación estándar; el valor de p se calcula usando ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Compuesto A frente a control).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de CPM mediante la administración del Compuesto A o control de vehículo. Los volúmenes tumorales se representaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La figura 5 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de CPM mediante la administración del Compuesto A o control de vehículo. DVD es dos veces al día; PO es dosificación oral; UVDX28 es una vez al día durante 28 días; Los volúmenes tumorales se representaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La Figura 6 son imágenes de tinción con hematoxilina y eosina de tejidos tumorales del estudio LU2514.

La figura 7 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de CPM mediante la administración del Compuesto A o control de vehículo. DVD es dos veces al día; PO es dosificación oral; UVDX21 es una vez al día durante 21 días; Los volúmenes tumorales se representaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La figura 8 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de CPM mediante la administración del Compuesto A o control de vehículo. Los volúmenes tumorales se representaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La figura 9 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de CPM mediante la administración del Compuesto A o control de vehículo. Los volúmenes tumorales se representaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La figura 10 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral de xenoinjertos de CPM mediante la administración del Compuesto A o control de vehículo. Los volúmenes tumorales se representaron como la media \pm error estándar de la media (EEM).

La Figura 11 es un gráfico que muestra las diferencias medias del volumen tumoral neto el día 46 para el estudio LU2527. El símbolo blanco representa datos que han sido objeto de censura estadística debido a un injerto tumoral deficiente; Los datos (no mostrados) de otro animal de control que salía el estudio el día 21 fueron objeto de censura estadística como muerte accidental posiblemente debido a un error de alimentación por sonda oral.

La figura 12 es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio para LU2527. Los volúmenes de los tumores se representan como media \pm error estándar (EEM). La línea vertical el día 46 indica el día del análisis de la ICT.

La figura 13 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal medio porcentual para LU2527. Los pesos corporales se representan como % de media \pm error estándar (EEM). La línea vertical el día 46 indica el día del análisis de la ICT y las líneas horizontales el cambio medio del peso corporal del 0 % y -10 %.

La figura 14 es un gráfico que muestra las diferencias medias del volumen tumoral neto el día 53 para el estudio GA0087. El símbolo blanco representa datos que han sido objeto de censura estadística debido a un injerto tumoral deficiente.

La figura 15 es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio para GA0087. Los volúmenes de los tumores se representan como media \pm error estándar (EEM). La línea vertical el día 53 indica el día del análisis de ICT.

La figura 16 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal medio porcentual para GA0087. Los pesos corporales se representan como % de media \pm error estándar (EEM). La línea vertical el día 53 indica el día del análisis de la ICT y las líneas horizontales el cambio medio del peso corporal del 0 % y -10 %.

La figura 17 es un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación de las líneas celulares hMCC con el Compuesto A. Porcentaje de control = número de células viables tratadas con el Compuesto A normalizado con respecto al número medio de células de control negativo viables, expresado como un porcentaje, como se describe en la sección de análisis de datos; Para cada gráfico, los datos se presentan como el porcentaje medio del control \pm desviación estándar para las copias biológicas.

La figura 18 es un gráfico que muestra los volúmenes netos de tumor MKL-1 el día 15. Los símbolos representan volúmenes tumorales netos. Se muestran el porcentaje (%) de ICT y el resultado estadístico para la diferencia en los volúmenes tumorales netos medios entre los grupos tratados con el Compuesto A y los grupos de control con vehículo como se muestra mediante las líneas de puntos.

La figura 19 es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio de MKL-1. Los volúmenes de los tumores se representan como media \pm error estándar (EEM). Se muestra una línea de puntos vertical el día 15, el día del análisis de la ICT.

La figura 20 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal medio porcentual para MKL-1. Los pesos corporales se representan como % de media \pm error estándar (EEM). Se muestra una línea de puntos vertical el día 15, el día del análisis de la ICT y una línea de puntos horizontal con un cambio medio del peso corporal del 0 %.

La figura 21 es un gráfico que muestra los volúmenes netos de tumor MS-1 el día 36. Los símbolos representan volúmenes tumorales netos con una línea discontinua horizontal a un volumen tumoral neto de 0 mm³. Se muestran el porcentaje (%) de ICT y el resultado estadístico para la diferencia en los volúmenes tumorales netos medios

entre los grupos tratados con el Compuesto A y los grupos de control con vehículo como se muestra mediante las líneas de puntos.

La figura 22 es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio de MS-1. Los volúmenes de los tumores se representan como media \pm error estándar (EEM). Se muestra una línea vertical el día 36, el día del análisis de la ICT.

La figura 23 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal medio porcentual para MS-1. Los pesos corporales se representan como % de media \pm error estándar (EEM). Se muestra una línea de puntos vertical el día 36, el día del análisis de la ICT y una línea de puntos horizontal con un cambio medio del peso corporal del 0 %.

La figura 24 es un gráfico que muestra la modulación de la expresión génica del Compuesto A identificada por sec de ARN. Los diagramas de Venn muestran los genes regulados negativamente (parte superior) o positivamente (parte inferior) en respuesta al Compuesto A 10 nM y/o 100 nM en dos líneas celulares hMCC, MKL-1 y MS-1.

La figura 25 es un gráfico que muestra la respuesta a la dosis del Compuesto A de la expresión del gen biomarcador farmacodinámico *in vitro* e *in vivo*. Las curvas de titulación muestran la respuesta a la dosis y los valores de CE₅₀ de cultivos celulares *in vitro* (izquierda) donde los símbolos de círculo blanco con una "x" son puntos que han sido objeto de censura estadística. Los diagramas de caja y bigotes correspondientes muestran la respuesta a la dosis *in vivo* en estudios de xenoinjerto (derecha). Las líneas de puntos indican las respuestas medias máximas.

La figura 26 es un gráfico que muestra el análisis ChIP-seq (Inmunoprecipitación de la Cromatina acoplada a Secuenciación, del inglés, *ChIP-sequencing*) de la ocupación de LSD1 y del estado de H3K4me2. Vista del explorador de genomas del enriquecimiento de LSD1 y H3K4me2 en los genes ST18 y FREM2 en las líneas celulares MKL-1 y MS-1 de hMCC. El rastro del pico de LSD1 (verde) demuestra la ubicación de las regiones enriquecidas con LSD1 en comparación con el fondo. Los rastros ChIP-seq de H3K4me2 (azul) muestran la unión de H3K4me2 en muestras tratadas con vehículo o con Compuesto A. Los rastros de entrada se muestran como control. El rastro RefSeq indica la ubicación y dirección de los genes.

La figura 27 es un gráfico que muestra diagramas de Kaplan-Meier. Los valores de *p* sin * son para comparaciones de rango logarítmico con el control y los valores con * son para comparaciones de rango logarítmico con monoterapia de etopósido. Se realizaron quince comparaciones lo que produjo un nivel de significación de $p \leq 0,003$ (Alfa = [0,05/15]).

La figura 28 es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio. Los volúmenes de los tumores se representan como media \pm error estándar (EEM). Las representaciones gráficas se interrumpieron cuando más del 50 % de los animales evaluables de un grupo salía del estudio.

La figura 29 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal medio porcentual. Los pesos corporales se representan como % de media \pm error estándar (EEM). Línea horizontal se sitúa en el cambio de peso corporal medio del 0 %. Las representaciones gráficas se interrumpieron cuando más del 50 % de los animales evaluables de un grupo salía del estudio.

La figura 30 es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral medio. UVD x 3= dosificación una vez al día durante tres días; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación. Los volúmenes de los tumores se representan como media \pm error estándar (EEM). Las representaciones gráficas se interrumpieron cuando más del 50 % de los animales evaluables de un grupo salía del estudio.

La figura 31 es un gráfico que muestra representaciones de Kaplan-Meier. UVD x 3= dosificación una vez al día durante tres días; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación. Los valores de *p* sin * son de comparaciones de orden logarítmico con el control, los valores de *p* con * son de comparaciones con monoterapia con etopósido y los valores de *p* con ** son de comparación con monoterapia con el Compuesto A. Se realizaron seis comparaciones lo que produjo un nivel de significación de $p \leq 0,008$ (Alfa = [0,05/6]).

La figura 32 es un gráfico que muestra el cambio de peso corporal medio porcentual. UVD x 3= dosificación una vez al día durante tres días; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación. Los pesos corporales se representan como % de media \pm error estándar (EEM). Las líneas horizontales se sitúan en el cambio de peso corporal medio del 0% y 10%. Las representaciones gráficas se interrumpieron cuando más del 50 % de los animales evaluables de un grupo salía del estudio.

La figura 33 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de proliferación celular LNCaP a lo largo del tiempo con el tratamiento de DHT 10 nM, DHT 10 nM más irradiaciones de 2 Gy, DHT 10 nM más Compuesto A 100 nM, y DHT 10 nM más Compuesto A 100 nM e irradiaciones de 2 Gy.

La figura 34 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de proliferación celular LNCaP con el tratamiento de DHT 10 nM, DHT 10 nM más irradiaciones de 2 Gy, DHT 10 nM más Compuesto A 100 nM, y DHT 10 nM más Compuesto A 100 nM e irradiaciones de 2 Gy

La figura 35 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de proliferación celular LNCaP a lo largo del tiempo sin ningún tratamiento, o con el tratamiento de EtOH, DMSO, Rapamicina 100 nM, Compuesto A 100 nM o la combinación de Rapamicina 100 nM y Compuesto A 100 nM.

La figura 36 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de proliferación celular LNCaP a lo largo del tiempo sin ningún tratamiento, o con el tratamiento de EtOH, DMSO, Rapamicina 100 nM, Compuesto A 100 nM o la combinación de Rapamicina 100 nM y Compuesto A 100 nM.

La figura 37 es un esquema que describe un diseño de estudio global útil para demostrar la seguridad o eficacia de las composiciones farmacéuticas.

La figura 38 es un esquema que muestra las recomendaciones publicadas para tratar la diarrea inducida por el tratamiento (Benson *et al.*, 22 J. Clin. Oncol. 2918 (2004)), modificadas para concordar con un protocolo de estudio

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una", y "el", "la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un agente" incluye una pluralidad de dichos agentes, y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células (o a una pluralidad de células) y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, etc. Cuando en el presente documento se utilizan intervalos para las propiedades físicas, tales como el peso molecular, o las propiedades químicas, tales como las fórmulas químicas, se pretende que estén incluidas todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y realizaciones específicas en los mismos. El término "aproximadamente" cuando se refiere a un número o intervalo numérico significa que el número o intervalo numérico al que se hace referencia es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico) y, por lo tanto, el número o intervalo numérico, en algunos casos, variará entre un 1 % y un 15 % del número o el intervalo numérico indicado. La expresión "que comprende" (y las expresiones relacionadas tales como "comprenden" o "comprende" o "que tiene" o "que incluye") no pretende excluir que, en otras ciertas realizaciones, por ejemplo, una realización de cualquier composición de materia, composición, método o proceso o similar, descritos en el presente documento, "consisten en" o "consisten esencialmente en" las características descritas.

Definiciones

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado más adelante.

"Amino" se refiere al radical -NH_2 .

"Ciano" se refiere al radical -CN .

"Nitro" se refiere al radical -NO_2 .

"Oxa" se refiere al radical -O- .

"Oxo" se refiere al radical $=\text{O}$.

"Tioxo" se refiere al radical $=\text{S}$.

"Imino" se refiere al radical $=\text{N-H}$.

"Oximo" se refiere al radical $=\text{N-OH}$.

"Hidrazino" se refiere al radical $=\text{N-NH}_2$.

"Alquilo" se refiere a un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene ninguna insaturación, que tiene de uno a quince átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{15}$). En determinadas realizaciones, un alquilo comprende de uno a trece átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{13}$). En determinadas realizaciones, un alquilo comprende de uno a ocho átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de uno a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de uno a cuatro átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de uno a tres átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de uno a dos átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de un átomo de carbono (por ejemplo, alquilo C_1). En otras realizaciones, un alquilo comprende de cinco a quince átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_5\text{-C}_{15}$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de cinco a ocho átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_5\text{-C}_8$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de uno a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_2\text{-C}_5$). En otras realizaciones, un alquilo comprende de tres a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquilo $\text{C}_3\text{-C}_5$). En otras realizaciones, el grupo alquilo se selecciona entre metilo, etilo, 1-propilo (*n*-propilo), 1-metiletilo (*iso*-propilo), 1-butilo (*n*-butilo), 1-metilpropilo (*sec*-butilo), 2-metilpropilo (*iso*-butilo), 1,1-dimetiletilo (*terc*-butilo), 1-pentilo (*n*-pentilo). El alquilo está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: halo, ciano, nitro, oxo, tioxo, imino, oximo, trimetilsilanilo, -OR^a , -SR^a , -OC(O)-R^a , $\text{-N(R}^a)_2$, -C(O)R^a , -C(O)OR^a , $\text{-C(O)N(R}^a)_2$, $\text{-N(R}^a)\text{C(O)OR}^a$, $\text{-OC(O)-N(R}^a)_2$, $\text{-N(R}^a)\text{C(O)R}^a$, $\text{-N(R}^a)\text{S(O)}_t\text{R}^a$ (donde t es 1 o 2), $\text{-S(O)}_t\text{OR}^a$ (donde t es 1 o 2), $\text{-S(O)}_t\text{R}^a$ (donde t es 1 o 2) y $\text{-S(O)}_t\text{N(R}^a)_2$ (donde t es 1 o 2) donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, carbociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), carbociclilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente

sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo).

"Alcoxi" se refiere a un radical unido a través de un átomo de oxígeno de la fórmula -O-alquilo, donde alquilo es una cadena alquilo como se ha definido anteriormente.

5

"Alquenilo" se refiere a un grupo radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que tiene de dos a doce átomos de carbono. En determinadas realizaciones, un alquenilo comprende de dos a ocho átomos de carbono. En otras realizaciones, un alquenilo comprende de dos a cuatro átomos de carbono. El alquenilo está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, etenilo (es decir, vinilo), prop-1-enilo (es decir, alilo), but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo y similares. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo alquenilo está opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: halo, ciano, nitro, oxo, tioxo, imino, oximo, trimetilsilanilo, -OR^a, -SR^a, -OC(O)-R^a, -N(R^a)₂, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)OR^a, -OC(O)-N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a, -N(R^a)S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tOR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2) y -S(O)_tN(R^a)₂ (donde t es 1 o 2) donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, carbociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), carbocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo).

"Alquinilo" se refiere a un grupo radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, que tiene de dos a doce átomos de carbono. En determinadas realizaciones, un alquinilo comprende de dos a ocho átomos de carbono. En otras realizaciones, un alquinilo comprende de dos a seis átomos de carbono. En otras realizaciones, un alquinilo comprende de dos a cuatro átomos de carbono. El alquinilo está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo y similares. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo alquinilo está opcionalmente sustituido con uno o más de los siguientes sustituyentes: halo, ciano, nitro, oxo, tioxo, imino, oximo, trimetilsilanilo, -OR^a, -SR^a, -OC(O)-R^a, -N(R^a)₂, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)OR^a, -OC(O)-N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a, -N(R^a)S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tOR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2) y -S(O)_tN(R^a)₂ (donde t es 1 o 2) donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, carbociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), carbocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo).

"Alquilenilo" o "cadena de alquilenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente, lineal o ramificada, que une el resto de la molécula a un grupo radical, que consiste únicamente en carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación y que tiene de uno a doce átomos de carbono, por ejemplo, metileno, etileno, propileno, n-butileno y similares. La cadena de alquilenilo está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo y al grupo radical a través de un enlace sencillo. El punto o puntos de unión de la cadena de alquilenilo al resto de la molécula y al grupo radical es a través de un carbono de la cadena de alquilenilo o a través de dos carbonos cualesquiera dentro de la cadena. En determinadas realizaciones, un alquilenilo comprende de uno a ocho átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₁-C₈). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de uno a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₁-C₅). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de uno a cuatro átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₁-C₄). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de uno a tres átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₁-C₃). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de uno a dos átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₁-C₂). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende un átomo de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₁). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de cinco a ocho átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₅-C₈). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de dos a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₂-C₅). En otras realizaciones, un alquilenilo comprende de tres a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquilenilo C₃-C₅). A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, una cadena de alquilenilo está opcionalmente sustituida con uno o más de los siguientes sustituyentes: halo, ciano, nitro, oxo, tioxo, imino, oximo, trimetilsilanilo, -OR^a, -SR^a, -OC(O)-R^a, -N(R^a)₂, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)OR^a, -OC(O)-N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a, -N(R^a)S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tOR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2) y -S(O)_tN(R^a)₂ (donde t es 1 o 2) donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, carbociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), carbocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo).

sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo).

"Alquinileno" o "cadena de alquinileno" se refiere a una cadena de hidrocarburo divalente lineal o ramificada que une el resto de la molécula a un grupo radical, que consiste únicamente en carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono y que tiene de dos a doce átomos de carbono. La cadena de alquinileno está unida al resto de la molécula a través de un enlace sencillo y al grupo radical a través de un enlace sencillo. En determinadas realizaciones, un alquinileno comprende de dos a ocho átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₂-C₈). En otras realizaciones, un alquinileno comprende de dos a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₂-C₅). En otras realizaciones, un alquinileno comprende de dos a cuatro átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₂-C₄). En otras realizaciones, un alquinileno comprende de dos a tres átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₂-C₃). En otras realizaciones, un alquinileno comprende dos átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₂). En otras realizaciones, un alquinileno comprende de cinco a ocho átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₅-C₈). En otras realizaciones, un alquinileno comprende de tres a cinco átomos de carbono (por ejemplo, alquinileno C₃-C₅). A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, una cadena de alquinileno está opcionalmente sustituida con uno o más de los siguientes sustituyentes: halo, ciano, nitro, oxo, tioxo, imino, oximo, trimetilsilanilo, -OR^a, -SR^a, -OC(O)-R^a, -N(R^a)₂, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)OR^a, -OC(O)-N(R^a)₂, -N(R^a)C(O)R^a, -N(R^a)S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tOR^a (donde t es 1 o 2), -S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2) y -S(O)_tN(R^a)₂ (donde t es 1 o 2) donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, carbociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), carbocicliclilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicliclilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo).

"Arido" se refiere a un radical obtenido a partir de un sistema anular de hidrocarburo aromático, monocíclico o multicíclico, eliminando un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono del anillo. El sistema anular de hidrocarburo aromático, monocíclico o multicíclico, contiene únicamente hidrógeno y carbono, de cinco a dieciocho átomos de carbono, donde al menos uno de los anillos en el sistema anular está completamente insaturado, es decir, contiene un sistema cíclico, de (4n+2) electrones π deslocalizados según la teoría de Hückel. El sistema anular a partir del cual se derivan los grupos arilo incluye, pero no se limita a, grupos tales como benceno, fluoreno, indano, indeno, tetralina y naftaleno. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (tal como en "aralquilo") pretende incluir radicales arilo opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, fluoroalquilo, ciano, nitro, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, aralquenilo opcionalmente sustituido, aralquinilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, carbocicliclilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, heterocicliclilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, -R^b-OR^a, -R^b-OC(O)-R^a, -R^b-OC(O)-OR^a, -R^b-OC(O)-N(R^a)₂, -R^b-N(R^a)₂, -R^b-C(O)R^a, -R^b-C(O)OR^a, -R^b-C(O)N(R^a)₂, -R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)₂, -R^b-N(R^a)C(O)OR^a, -R^b-N(R^a)C(O)R^a, -R^b-N(R^a)S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2), -R^b-S(O)_tR^a (donde t es 1 o 2), -R^b-S(O)_tOR^a (donde t es 1 o 2) y -R^b-S(O)_tN(R^a)₂ (donde t es 1 o 2), donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, cicloalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), cicloalquilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicliclilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), cada R^b es independientemente un enlace directo o una cadena de alquilenilo o alquenileno lineal o ramificada, y R^c es una cadena de alquilenilo o alquenileno lineal o ramificada, y donde cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique lo contrario.

"Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula -R^c-arilo donde R^c es una cadena de alquilenilo como se ha definido anteriormente, por ejemplo, metileno, etileno y similares. La parte de la cadena de alquilenilo del radical aralquilo está opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para una cadena de alquilenilo. La parte de arilo del radical aralquilo está opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para un grupo arilo.

"Aralquenilo" se refiere a un radical de fórmula -R^d-arilo en donde R^d es una cadena de alquenileno como se ha definido anteriormente. La parte arilo del radical aralquenilo está opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para un grupo arilo. La parte de la cadena de alquenileno del radical aralquenilo está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un grupo alquenileno.

"Aralquinilo" se refiere a un radical de fórmula -R^e-arilo, donde R^e es una cadena de alquinileno como se ha definido anteriormente. La parte arilo del radical aralquinilo está opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para un grupo arilo. La parte de la cadena de alquinileno del radical aralquinilo está opcionalmente sustituida como se

ha definido anteriormente para una cadena de alquilileno.

"Aralcoxi" se refiere a un radical unido mediante un átomo de oxígeno de la fórmula $-O-R^c$ -arilo, donde R^c es una cadena de alquileno como se ha definido anteriormente, por ejemplo, metileno, etileno y similares. La parte de la cadena de alquileno del radical aralquilo está opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para una cadena de alquileno. La parte de arilo del radical aralquilo está opcionalmente sustituida como se ha descrito anteriormente para un grupo arilo.

"Carbociclilo" se refiere a un radical de hidrocarburo no aromático estable, monocíclico o policíclico, que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que incluye sistemas anulares condensados o puenteados, que tienen de tres a quince átomos de carbono. En determinadas realizaciones, un carbociclilo comprende de tres a diez átomos de carbono. En otras realizaciones, un carbociclilo comprende de cinco a siete átomos de carbono. El carbociclilo está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. El carbociclilo está saturado (es decir, que contiene solamente enlaces C-C sencillos) o insaturado (es decir, que contiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces).

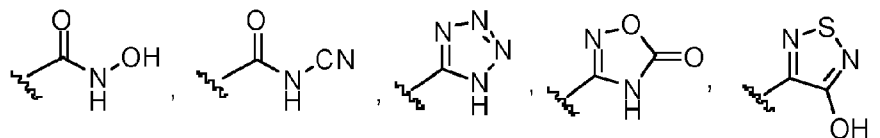
Un radical carbociclilo completamente saturado se denomina también "cicloalquilo". Los ejemplos de cicloalquilos monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Un carbociclilo insaturado también se denomina "cicloalquenilo". Los ejemplos de cicloalquenos monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y ciclooctenilo. Los radicales de carbociclilo policíclicos incluyen, por ejemplo, adamantilo, norbornilo (es decir, biciclo[2.2.1]heptanilo), norbornenilo, decalinilo, 7,7-dimetilbicyclo[2.2.1]heptanilo y similares. A menos que se indique lo contrario específicamente en la memoria descriptiva, el término "carbociclilo" pretende incluir radicales carbociclilo que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, fluoroalquilo, oxo, tioxo, ciano, nitro, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, aralquenilo opcionalmente sustituido, aralquinilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, carbocicilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, heterocicilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, $-R^b-OR^a$, $-R^b-OC(O)-R^a$, $-R^b-OC(O)-OR^a$, $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)_2$, $-R^b-C(O)R^a$, $-R^b-C(O)OR^a$, $-R^b-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$, $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$, $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (donde t es 1 o 2), $-R^b-S(O)_tR^a$ (donde t es 1 o 2), $-R^b-S(O)_tOR^a$ (donde t es 1 o 2) y $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, cicloalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), cicloalquilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), cada R^b es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileno o alquenileno lineal o ramificada, y R^c es una cadena de alquileno o alquenileno lineal o ramificada, y donde cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique lo contrario.

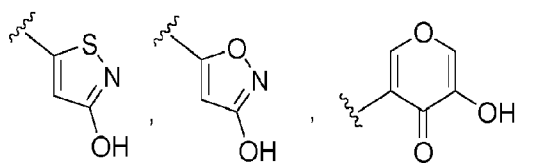
"Carbocicilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R^c$ -carbociclilo donde R^c es una cadena de alquileno como se ha definido anteriormente. La cadena de alquileno y el radical carbociclilo están opcionalmente sustituidos como se ha definido anteriormente.

"Carbocicilalquinilo" se refiere a un radical de fórmula $-R^c$ -carbociclilo en donde R^c es una cadena de alquilileno como se ha definido anteriormente. La cadena de alquilileno y el radical carbociclilo están opcionalmente sustituidos como se ha definido anteriormente.

"Carbicicilalcoxi" se refiere a un radical unido mediante un átomo de oxígeno de la fórmula $-O-R^c$ -carbociclilo en donde R^c es una cadena de alquileno como se ha definido anteriormente. La cadena de alquileno y el radical carbociclilo están opcionalmente sustituidos como se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, "bioisótero del ácido carboxílico" se refiere a un grupo o resto funcional que exhibe propiedades físicas, biológicas y/o químicas similares a las del resto ácido carboxílico. Los ejemplos de bioisósteros de ácido carboxílico incluyen, pero no se limita a,





y similares.

5 "Halo" o "halógeno" se refiere a sustituyentes de bromo, cloro, flúor o yodo.

"Fluoroalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se ha definido anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales flúor, como se ha definido anteriormente, por ejemplo, trifluorometilo, difluorometilo, fluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo y similares. En algunas realizaciones, la parte alquilo del radical fluoroalquilo
10 está opcionalmente sustituida como se definió anteriormente para un grupo alquilo.

"Heterociclilo" se refiere a un radical de anillo no aromático estable, de 3 a 18 miembros, que comprende de dos a doce átomos de carbono y de uno a seis heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el radical heterociclilo es un sistema anular
15 monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que incluye opcionalmente sistemas anulares condensados o puenteados. Los heteroátomos del radical heterociclilo están eventualmente oxidados. Uno o más átomos de nitrógeno, si están presentes, están opcionalmente cuaternizados. El radical heterociclilo está parcial o totalmente saturado. El heterociclilo está unido al resto de la molécula mediante cualquier átomo del anillo o anillos. Los ejemplos de dichos radicales heterociclilo incluyen, pero no se limita a, dioxolanilo, tienil[1,3]ditianilo, decahidroisquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, quinuclidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrofurilo, tritanilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el término "heterociclilo" pretende incluir radicales heterociclilo como se han definido anteriormente que están
25 opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo, alqueno, alquino, halo, fluoroalquilo, oxo, tioxo, ciano, nitro, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, aralqueno opcionalmente sustituido, aralquino opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, carbocicliclalquilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, heterocicliclalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, $-R^b-OR^a$, $-R^b-OC(O)-R^a$, $-R^b-OC(O)-OR^a$, $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)_2$, $-R^b-C(O)R^a$, $-R^b-C(O)OR^a$, $-R^b-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$, $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$, $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (donde t es 1 o 2), $-R^b-S(O)_tR^a$ (donde t es 1 o 2), $-R^b-S(O)_tOR^a$ (donde t es 1 o 2) y $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), fluoroalquilo, cicloalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), cicloalquilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterociclilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heterocicliclalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxi o trifluorometilo), cada R^b es independientemente un enlace directo o una cadena de alqueno o alqueno lineal o ramificada, y R^c es una cadena de alqueno o alqueno lineal o ramificada, y donde cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique lo contrario.

"N-heterociclilo" o "heterociclilo unido a N" se refiere a un radical heterociclilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un nitrógeno y donde el punto de unión del radical heterociclilo al resto de la molécula es mediante un átomo de nitrógeno en el radical heterociclilo. Un radical N-heterociclilo está opcionalmente sustituido como se ha descrito anteriormente para los radicales heterociclilo. Los ejemplos de dichos radicales N-heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, 1-morfolinilo, 1-piperidinilo, 1-piperazinilo, 1-pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo e imidazolidinilo.
45

"C-heterociclilo" o "heterociclilo unido a C" se refiere a un radical heterociclilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un heteroátomo y donde el punto de unión del radical heterociclilo al resto de la molécula es mediante un átomo de carbono en el radical heterociclilo. Un radical C-heterociclilo está opcionalmente sustituido como se ha descrito anteriormente para los radicales heterociclilo. Los ejemplos de dichos radicales C-heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, 2-morfolinilo, 2- o 3- o 4-piperidinilo, 2-piperazinilo, 2- o 3-pirrolidinilo y similares.
50

"Heterocicliclalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R^c$ -heterociclilo en donde R^c es una cadena de alqueno como se ha definido anteriormente. Si el heterociclilo es un heterociclilo que contiene nitrógeno, el heterociclilo está opcionalmente unido al radical alquilo en el átomo de nitrógeno. La cadena de alqueno del radical heterocicliclalquilo está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para una cadena de alqueno. La parte de heterociclilo del radical heterocicliclalquilo está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un grupo heterociclilo.
60

"Heterociclicilalcoxi" se refiere a un radical unido mediante un átomo de oxígeno de la fórmula $-O-R^c$ -heterociclicilo, donde R^c es una cadena de alquileo como se ha definido anteriormente. Si el heterociclicilo es un heterociclicilo que contiene nitrógeno, el heterociclicilo está opcionalmente unido al radical alquilo en el átomo de nitrógeno. La cadena de alquileo del radical heterociclicilalcoxi está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para una cadena de alquileo. La parte heterociclicilo del radical heterociclicilalcoxi está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un grupo heterociclicilo.

"Heteroarilo" se refiere a un radical derivado de un radical de anillo aromático de 3 a 18 miembros que comprende de dos a diecisiete átomos de carbono y de uno a seis heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Como se usa en el presente documento, el radical heteroarilo es un sistema anular monocíclico, bicíclico, trícíclico o tetracíclico, en donde al menos uno de los anillos en el sistema de anillos está totalmente insaturado, es decir, contiene un sistema cíclico, de $(4n+2)$ electrones π deslocalizados según la teoría de Hückel. El heteroarilo incluye sistemas anulares condensados o puenteados. El heteroátomo o heteroátomos en el radical heteroarilo están opcionalmente oxidados. Uno o más átomos de nitrógeno, si están presentes, están opcionalmente cuaternizados. El heteroarilo está unido al resto de la molécula mediante cualquier átomo del anillo o anillos. Los ejemplos de heteroarilos incluyen, pero no se limitan a, azepinilo, acridinilo, benzoimidazolilo, benzindolilo, 1,3-benzodioxolilo, benzofuranilo, benzooxazolilo, benzo[d]tiazolilo, benzotiadiazolilo, benzo[b][1,4]dioxepinilo, benzo[b][1,4]oxazinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzonaftofuranilo, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzopiranilo, benzopiranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo (benzotiofenilo), benzotieno[3,2-d]pirimidinilo, benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinilo, carbazolilo, cinolinilo, ciclopenta[d]pirimidinilo, 6,7-dihidro-5H-ciclopenta[4,5]tieno[2,3-d]pirimidinilo, 5,6-dihidrobenczo[h]quinazolinilo, 5,6-dihidrobenczo[h]cinolinilo, 6,7-dihidro-5H-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-c]piridazinilo, dibenzofuranilo, dibenzotiofenilo, furanilo, furanonilo, furo[3,2-c]piridinilo, 5,6,7,8,9,10-hexahidrocicloocta[d]pirimidinilo, 5,6,7,8,9,10-hexahidrocicloocta[d]piridazinilo, 5,6,7,8,9,10-hexahidrocicloocta[d]piridinilo, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, isoquinolilo, indolizínilo, isoxazolilo, 5,8-metan-5,6,7,8-tetra-hidroquinazolinilo, naftiridinilo, 1,6-naftiridinonilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxiranilo, 5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahidrobenczo[h]quinazolinilo, 1-fenil-1H-pirrolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirazolilo, pirazolo[3,4-d]pirimidinilo, piridinilo, pirido[3,2-d]pirimidinilo, pirido[3,4-d]pirimidinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahydroquinolinilo, 5,6,7,8-tetrahydroquinazolinilo, 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidinilo, 6,7,8,9-tetra-hidro-5H-ciclohepta[4,5]tieno[2,3-d]pirimidinilo, 5,6,7,8-tetrahidropirido[4,5-c]piridazinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, triazinilo, tieno[2,3-d]pirimidinilo, tieno[3,2-d]pirimidinilo, tieno[2,3-c]pridinilo y tiofenilo (es decir, tienilo). A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el término "heteroarilo" pretende incluir radicales heteroarilo, como se han definido anteriormente, que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo, alquenilo, alquilino, halo, fluoroalquilo, haloalqueno, haloalquilino, oxo, tioxo, ciano, arilo opcionalmente sustituido, aralquilo opcionalmente sustituido, aralqueno opcionalmente sustituido, aralquilino opcionalmente sustituido, carbociclicilo opcionalmente sustituido, carbociclicilalquilo opcionalmente sustituido, heterociclicilo opcionalmente sustituido, heterociclicilalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, $-R^b-OR^a$, $-R^b-OC(O)-R^a$, $-R^b-OC(O)-OR^a$, $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)_2$, $-R^b-C(O)R^a$, $-R^b-C(O)OR^a$, $-R^b-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$, $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$, $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (donde t es 1 o 2), $-R^b-S(O)_tR^a$ (donde t es 1 o 2), $-R^b-S(O)_tOR^a$ (donde t es 1 o 2) y $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (donde t es 1 o 2), donde cada R^a es independientemente hidrógeno, alquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), fluoroalquilo, cicloalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), cicloalquilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), arilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), aralquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), heterociclicilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), heterociclicilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), heteroarilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo) o heteroarilalquilo (opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, metoxilo o trifluorometilo), cada R^b es independientemente un enlace directo o una cadena de alquileo o alquilenilo lineal o ramificada, y R^c es una cadena de alquileo o alquilenilo lineal o ramificada, y donde cada uno de los sustituyentes anteriores está sin sustituir a menos que se indique lo contrario.

"N-heteroarilo" se refiere a un radical heteroarilo como se ha definido anteriormente que contiene al menos un nitrógeno y donde el punto de unión del radical heteroarilo al resto de la molécula es a través de un átomo de nitrógeno en el radical heteroarilo. Un radical N-heteroarilo está opcionalmente sustituido como se ha descrito anteriormente para radicales heteroarilo.

"C-heteroarilo" se refiere a un radical heteroarilo como se ha definido anteriormente y donde el punto de unión del radical heteroarilo al resto de la molécula es a través de un átomo de carbono en el radical heteroarilo. Un radical C-heteroarilo está opcionalmente sustituido como se ha descrito anteriormente para heteroarilo radicales.

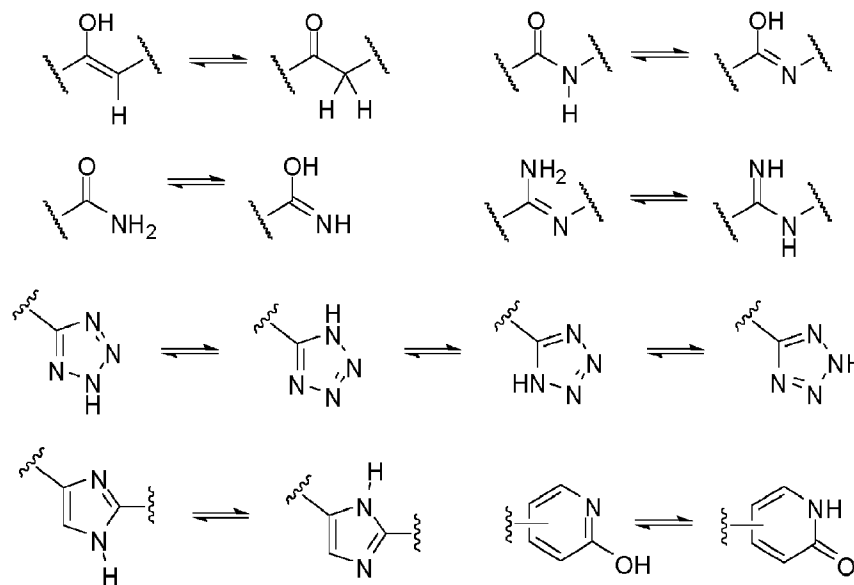
"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R^c$ -heteroarilo, donde R^c es una cadena de alquileo como se ha definido anteriormente. Si el heteroarilo es un heteroarilo que contiene nitrógeno, el heteroarilo está opcionalmente unido al radical alquilo en el átomo de nitrógeno. La cadena de alquileo del radical heteroarilalquilo está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para una cadena de alquileo. La parte de heteroarilo del

radical heteroarilalquilo está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un grupo heteroarilo.

"Heteroarilalcoxi" se refiere a un radical unido mediante un átomo de oxígeno de fórmula $-O-R^c$ -heteroarilo, donde R^c es una cadena de alquileo como se ha definido anteriormente. Si el heteroarilo es un heteroarilo que contiene nitrógeno, el heteroarilo está opcionalmente unido al radical alquilo en el átomo de nitrógeno. La cadena de alquileo del radical heteroarilalcoxi está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para una cadena de alquileo. La parte heteroarilo del radical heteroarilalcoxi está opcionalmente sustituida como se ha definido anteriormente para un grupo heteroarilo.

Los compuestos divulgados en el presente documento, en algunas realizaciones, contienen uno o más centros asimétricos y por lo tanto dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que se definen, en términos de estereoquímica absoluta, como (*R*)- o (*S*)-. A menos que se indique lo contrario, se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos divulgados en el presente documento estén contempladas en esta divulgación. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen dobles enlaces alqueno, y a menos que se especifique otra cosa, se pretende que esta divulgación incluya ambos isómeros geométricos *E* y *Z* (por ejemplo, *cis* o *trans*). Del mismo modo, todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras, y todas las formas tautoméricas también pretenden quedar incluidas. La expresión "isómero geométrico" se refiere a isómeros geométricos *E* o *Z* (por ejemplo, *cis* o *trans*) de un doble enlace alqueno. La expresión "isómero posicional" se refiere a los isómeros estructurales alrededor de un anillo central, tales como los isómeros *orto*, *meta* y *para* alrededor de un anillo de benceno.

Un "tautómero" se refiere a una molécula en donde es posible un desplazamiento de protón desde un átomo de una molécula hasta otro átomo de la misma molécula. Los compuestos presentados en el presente documento, en determinadas realizaciones, existen en forma de tautómeros. En circunstancias en las que es posible la tautomerización, existirá un equilibrio químico de los tautómeros. La relación exacta de los tautómeros depende de varios factores, que incluyen el estado físico, la temperatura, el disolvente y el pH. Algunos ejemplos de equilibrio tautomérico incluyen:



"Sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales de adición tanto de ácidos como de bases. Se pretende que una sal farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de los compuestos derivados heterocíclicos sustituidos descritos en el presente documento abarque todas y cada una de las formas de sal farmacéuticamente adecuadas. Son sales farmacéuticamente aceptables preferidas de los compuestos descritos en el presente documento, las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables.

"Sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no son biológicamente o de otra manera indeseables, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido yodhídrico, ácido fluorhídrico, ácido fosforoso y similares. También se incluyen las sales que se forman con ácidos orgánicos, tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc., e incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Por lo tanto, las sales a modo de ejemplo incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, nitratos, fosfatos,

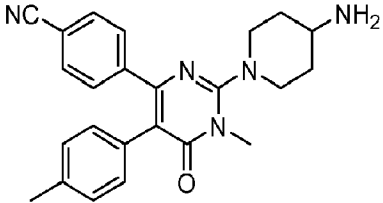
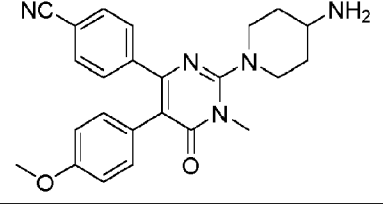
monohidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, trifluoroacetatos, propionatos, caprilatos, isobutiratos, oxalatos, malonatos, suberatos de succinato, sebacatos, fumaratos, maleatos, mandelatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, ftalatos, bencenosulfonatos, toluenosulfonatos, fenilacetatos, citratos, lactatos, malatos, tartratos, metanosulfonatos y similares. También se contemplan sales de aminoácidos, tales como arginatos, gluconatos y galacturonatos (véase, por ejemplo, Berge S. M. *et al.*, *Pharmaceutical Salts*, J. Pharma. Sci. 66: 1-19 (1997)). Las sales de adición de ácido de compuestos básicos, en algunas realizaciones, se preparan poniendo en contacto las formas de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal según métodos y técnicas con los que está familiarizado un experto en la materia.

"Sal de adición de bases farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o de una base orgánica al ácido libre. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, en algunas realizaciones, se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Las sales obtenidas a partir de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales obtenidas a partir de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, *N,N*-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, etilendianilina, *N*-metilglucamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, *N*-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Véase Berge *et al.*, citado anteriormente.

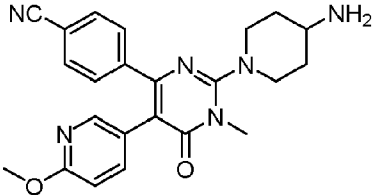
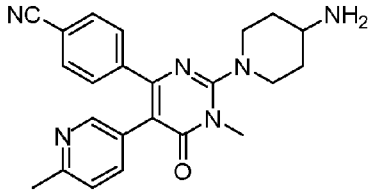
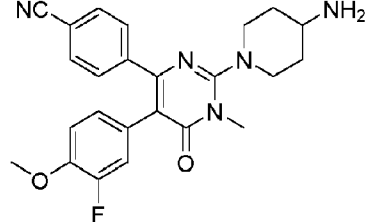
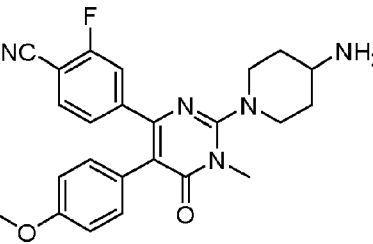
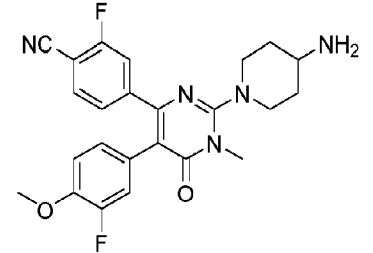
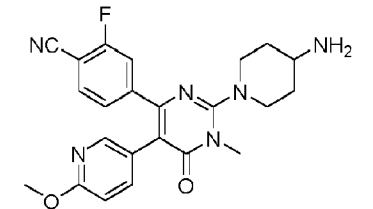
Compuestos derivados heterocíclicos sustituidos

Los compuestos derivados heterocíclicos sustituidos útiles para la inhibición de LSD-1 incluyen los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 14/701.304, presentada el 30 de abril de 2015 (ahora patente de Estados Unidos n.º 9.255.097), solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 14/988.022, presentada el 5 de enero de 2016, solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 15/018.814, presentada el 8 de febrero de 2016, y la solicitud internacional de patente n.º PCT/US2015/028635, todas las cuales reivindican los derechos de prioridad de la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 61/987.354, presentada el 1 de mayo de 2014; así como los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos con n.º de serie 62/251.507, presentada el 5 de noviembre de 2015.

El compuesto derivado heterocíclico sustituido de la invención se ilustra en el ejemplo 7 de síntesis química proporcionado en la tabla 1. El resto de ejemplos de síntesis química siguientes no son parte de la invención. Son ejemplos de referencia.

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
1		4-(2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-4-il)-benzonitrilo
2		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxifenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
3		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
4		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metilpiridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
5		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxifenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-il]-benzonitrilo
6		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxifenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
7		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
8		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
9		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
10		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-etil-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
11		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
12		2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
13		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
14		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-ciclopentiletilinil-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
15		ácido [2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
16		2-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acetamida
17		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-(3-hidroxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
18		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-benzofuran-5-il-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
19		2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-carbonitrilo
20		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-cloro-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
21		2-fluoro-4-[1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
22		4-[2-(2,8-diaza-espiro[4.5]dec-8-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
23		4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-6-oxo-5-[6-(trifluorometil)(3-piridil)]hidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo
24		4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo
25		4-[2-((3R)-3-aminopiperidil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo
26		4-[2-(4-aminopiperidil)-5-(5-fluoro-6-metoxi(3-5,6-dihidropiridil))-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo
27		4-[2-((3R)-3-aminopirrolidinil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
28		4-[2-((3S)-3-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
29		4-[2-((3S)-3-amino-pirrolidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
30		4-[2-((3R)-3-aminopiperidil)-5-(4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidro-pirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo
31		4-[2-((3S)-3-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
32		4-[2-(4-amino-4-metil-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
33		4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(1-metil(1H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
34		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
35		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
36		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
37		4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo
38		4-[2-(4-aminopiperidil)-5-(3,5-difluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo
39		ácido 4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-ciano-3-fluorofenil)-3-metil-4-oxo-3-hidropirimidin-5-il]benzoico

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
40		{4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-cianofenil)-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-5-il)]-2-fluorofenil}-N-metilcarboxamida
41		4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-cianofenil)-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-5-il)]-2-fluorobenzamida
42		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-(1-oxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
43		ácido 3-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il]-benzoico
44		4-{5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3S)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-benzonitrilo
45		4-{5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3R)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-benzonitrilo

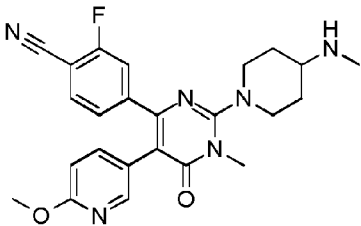
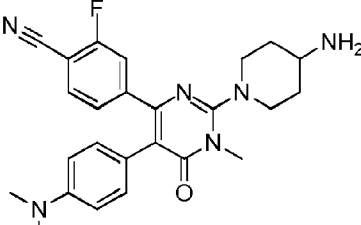
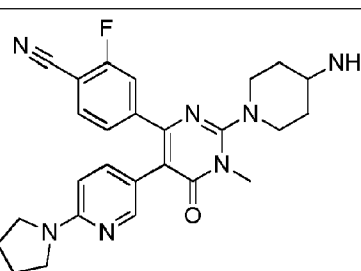
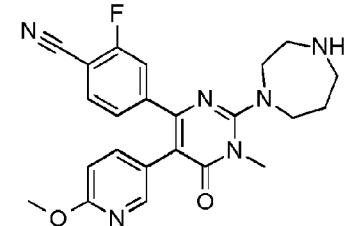
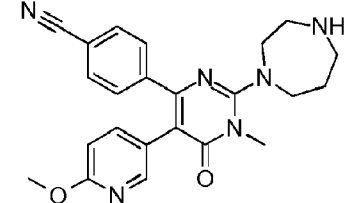
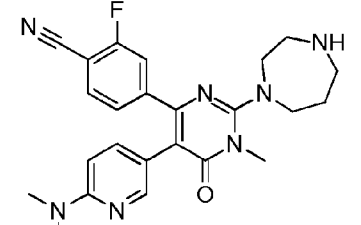
(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
46		4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
47		2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-piperazin-1-il-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
48		4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-4-ilamino)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
49		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-2'-dimetilamino-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-[5,5']bipirimidinil-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
50		metilamida del ácido 5-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il]-piridin-2-carboxílico
51		2-fluoro-4-{5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3S)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
52		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3R)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
53		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-4-ilamino)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
54		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-(3S)-pirrolidin-3-ilmetil-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
55		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-piperidin-4-il-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
56		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-pirrolidin-3-ilmetil-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
57		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
58		2-fluoro-4-[5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
59		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-dimetilamino-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
60		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-(6-pirrolidin-1-il-piridin-3-il)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
61		4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro benzonitrilo
62		4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
63		4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
64		4-[2-(3-amino-azetidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
65		2-fluoro-4-[1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
66		4-[2-[1,4]diazepan-1-il-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
67		4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
68		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-morfolin-4-il-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
69		4-[2-(3-aminometil-azetidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
70		2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(3-metilaminometil-azetidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo
71		4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
72		4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
73		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indol-5-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
74		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
75		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

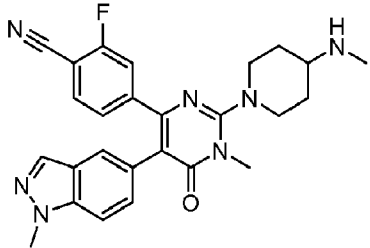
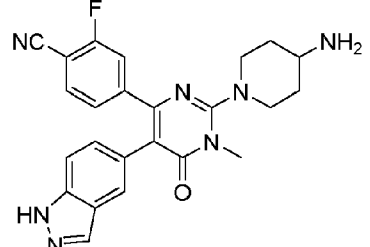
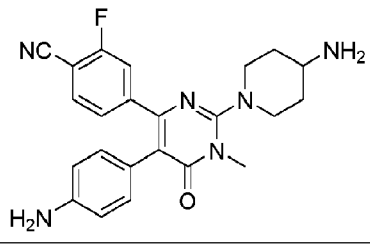
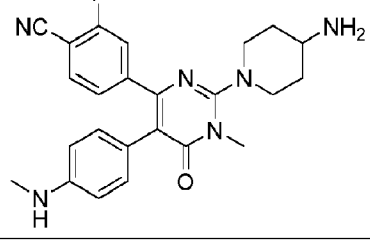
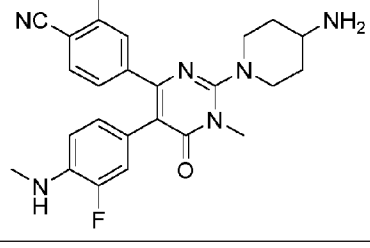
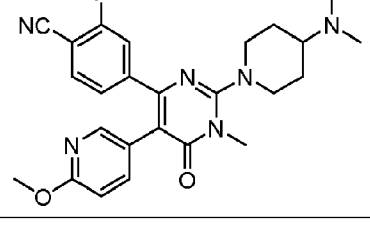
(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
76		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indol-6-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
77		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indazol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
78		4-[2-((4R,3S)-4-amino-3-fluoro-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
79		4-[2-((4S,3R)-4-amino-3-fluoro-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
80		4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-6-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
81		4-[2'-dimetilamino-2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-[5,5']bipirimidinil-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
82		4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
83		4-[5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
84		4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-5-(2H-indazol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
85		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil deuterado-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
86		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi deuterado-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
87		2-fluoro-4-[1-metil-2-[4-(metilamino)piperidin-1-il]-5-(1-metilindazol-5-il)-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo
88		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(1H-indazol-5-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
89		4-[5-(4-aminofenil)-2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
90		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-5-[4-(metilamino)fenil]-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
91		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[3-fluoro-4-(metilamino)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
92		4-[2-[4-(dimetilamino)piperidin-1-il]-5-(6-metoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
93		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(6-etoxi-5-fluoropiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
94		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(6-etoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
95		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-etoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
96		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxiETOXI)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
97		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxiETOXI)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo
98		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-metoxiETOXI)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
99		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxi-etil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
100		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(hidroximetil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
101		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-fluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
102		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
103		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3,5-difluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
104		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3,4-difluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
105		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-5-(4-metilsulfonilfenil)-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
106		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
107		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(metoximetil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
108		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo
109		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-ciclopropilmetil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo
110		4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-ciclopropilmetil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

(continuación)

TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
111		2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-cloro-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxifenil)-3-metil-3H-pirimidin-4-ona
112		2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-hidroxi-fenil)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-3H-pirimidin-4-ona
113		2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-fluoro-fenil)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-3H-pirimidin-4-ona
114		2-(4-amino-piperidin-1-il)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-fenil-3H-pirimidin-4-ona
115		2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-3-metil-6-piridin-4-il-3H-pirimidin-4-ona
116		2-(4-amino-piperidin-1-il)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-piridin-4-il-3H-pirimidin-4-ona
117		2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-metoxi-fenil)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-3H-pirimidin-4-ona

(continuación)

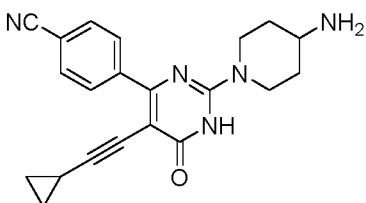
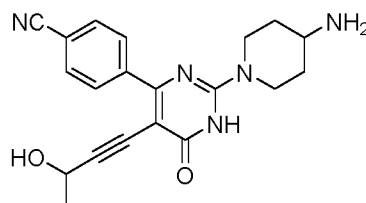
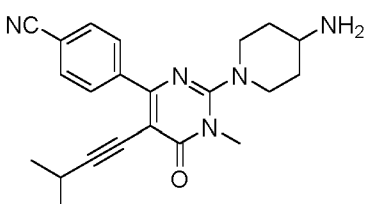
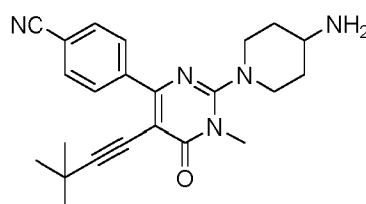
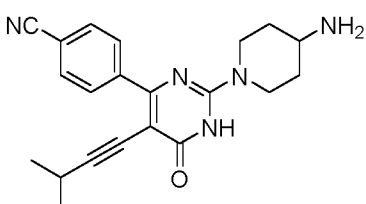
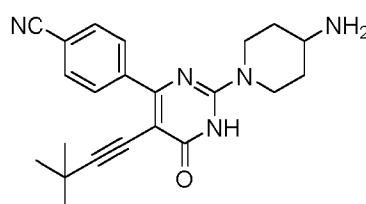
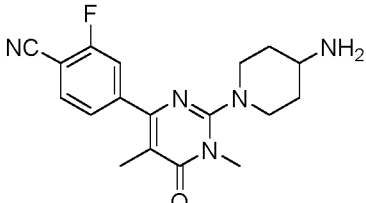
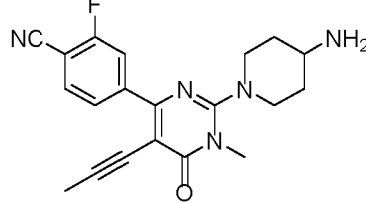
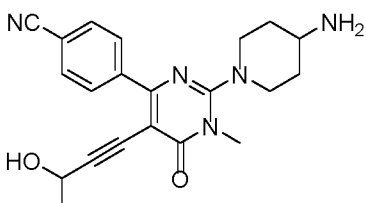
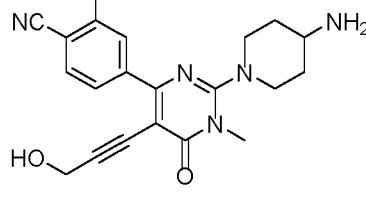
TABLA 1		
Ejemplo de síntesis química	Estructura	Nombre
118		3-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo
119		2-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo
120		2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-carbonitrilo
121		2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-carbonitrilo
122		4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-1H-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo

En algunas realizaciones, que no forman parte de la presente invención, el compuesto derivado heterocíclico sustituido descrito en este documento tiene la estructura proporcionada en la tabla 2.

TABLA 2

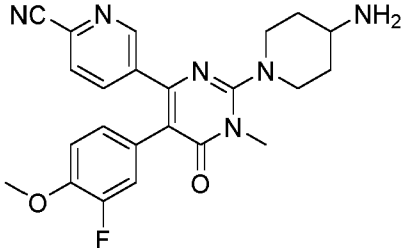
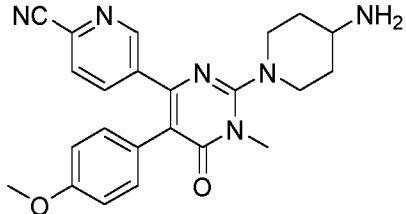
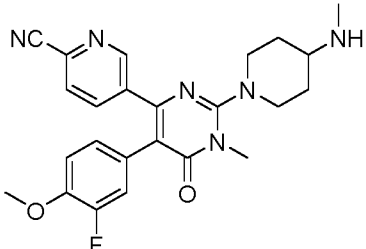
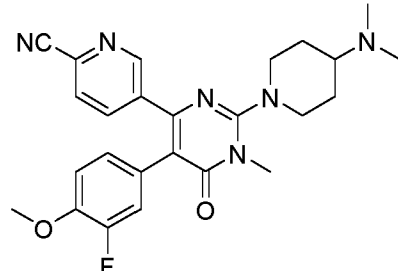
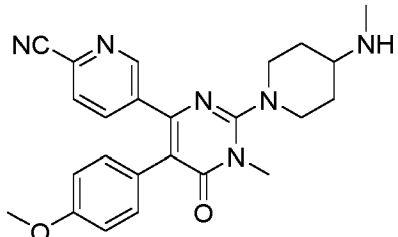
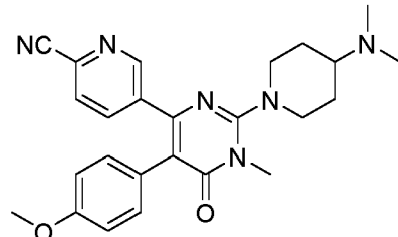
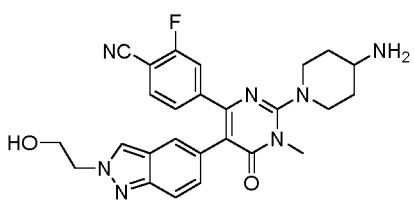
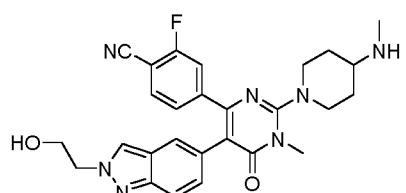
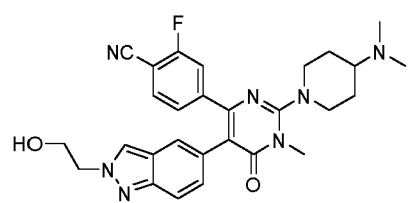
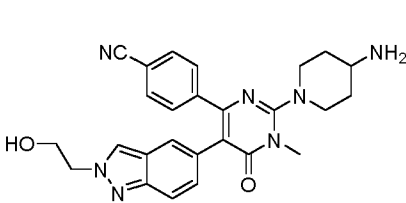
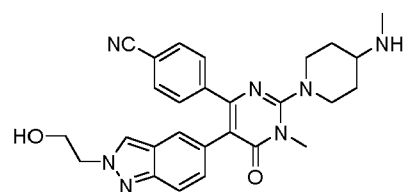
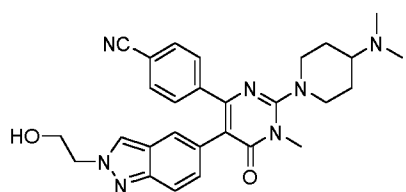
(continuación)

TABLA 2

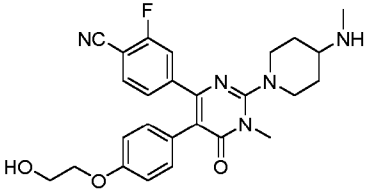
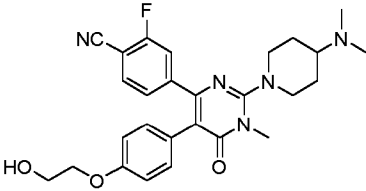
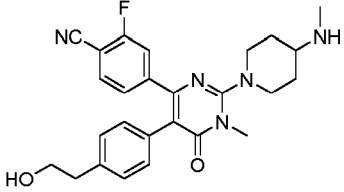
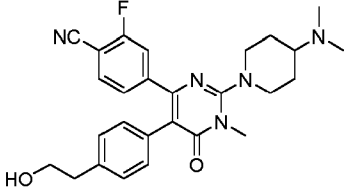
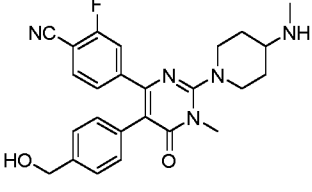
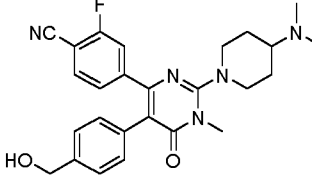
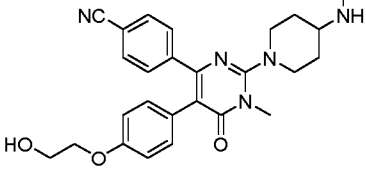
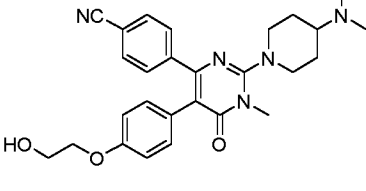
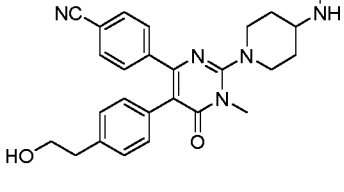
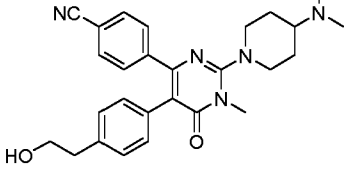
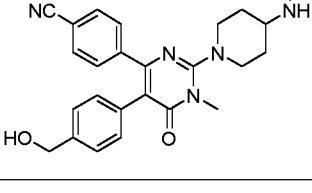
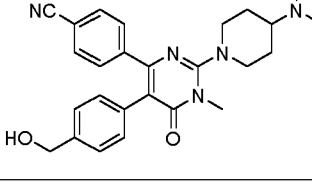
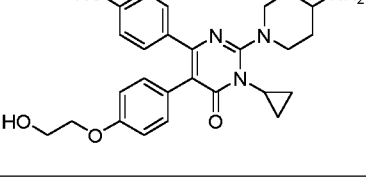
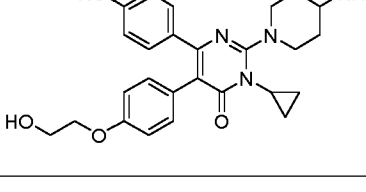
	
	
	
	
	

(continuación)

TABLA 2

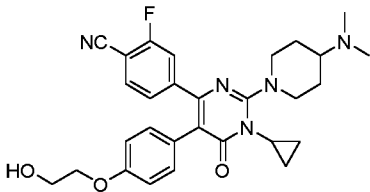
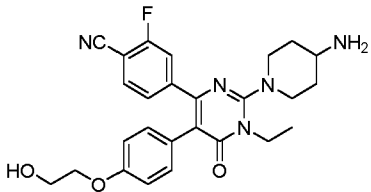
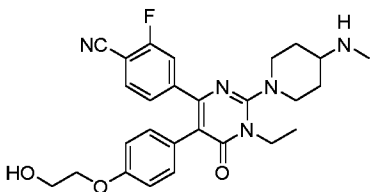
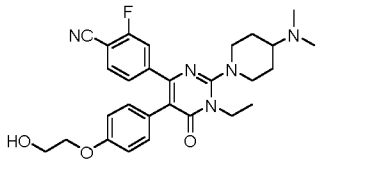
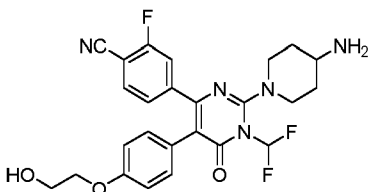
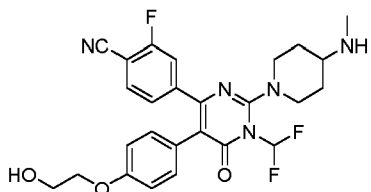
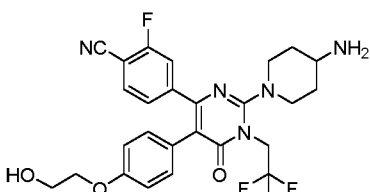
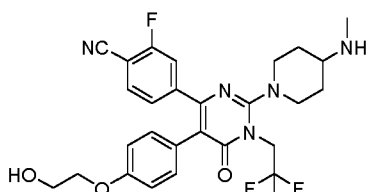
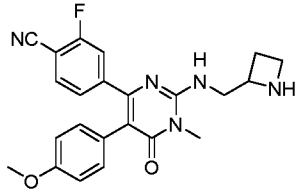
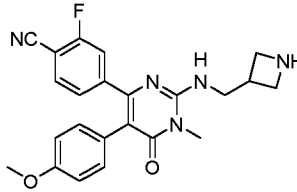
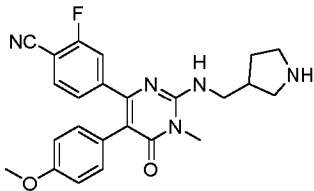
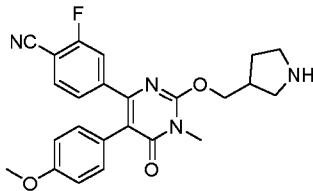
	
	
	
	
	
	

(continuación)

TABLA 2	
	
	
	
	
	
	
	

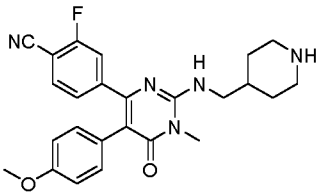
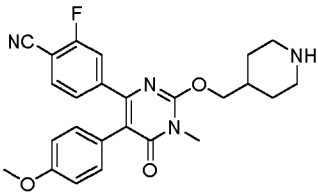
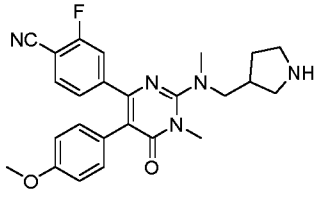
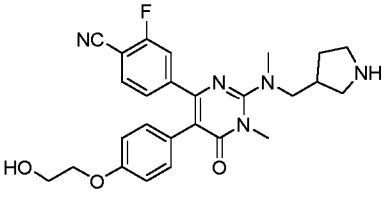
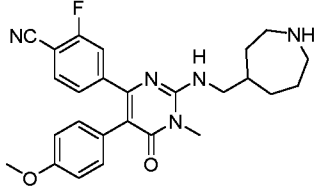
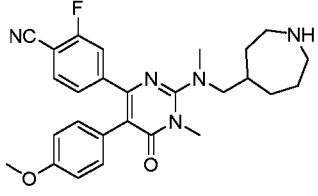
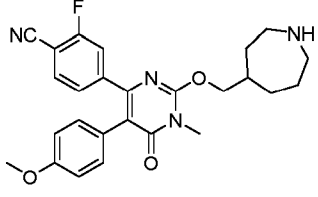
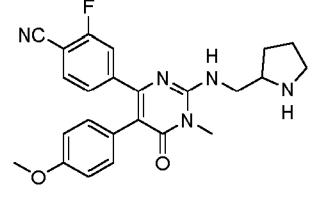
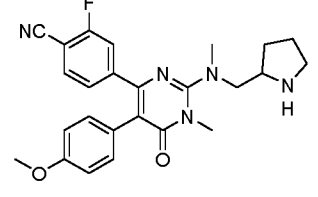
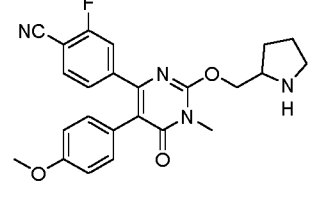
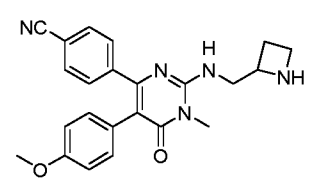
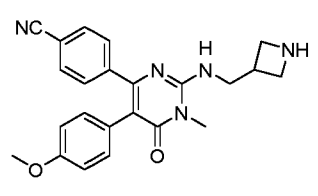
(continuación)

TABLA 2

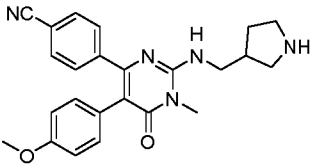
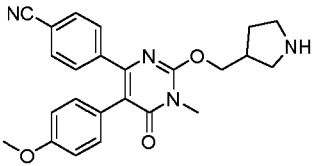
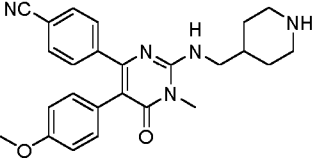
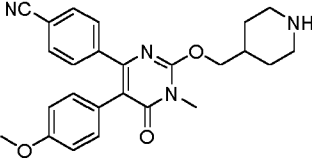
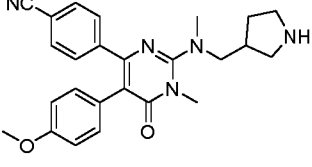
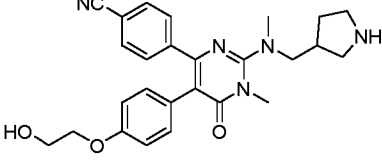
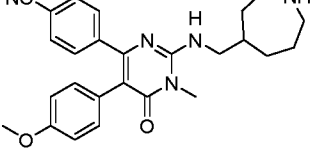
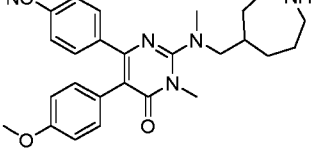
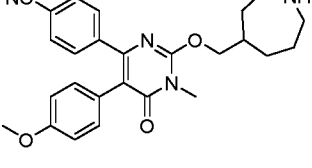
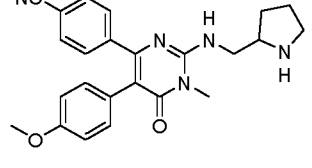
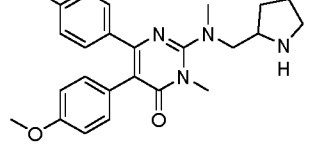
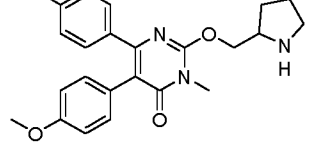
(continuación)

TABLA 2

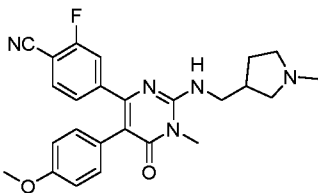
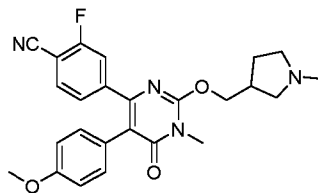
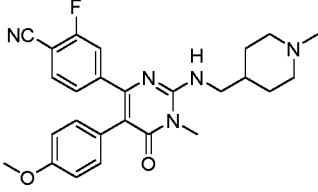
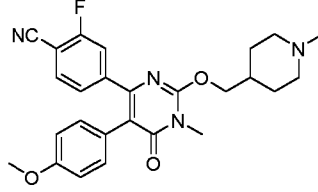
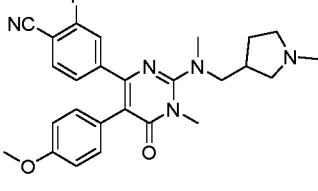
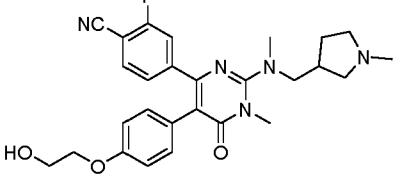
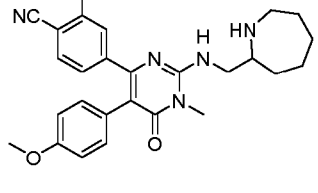
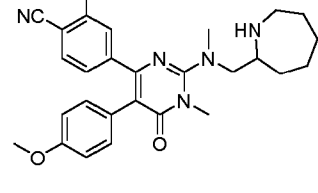
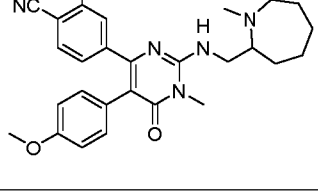
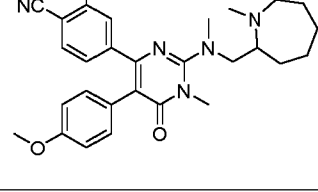
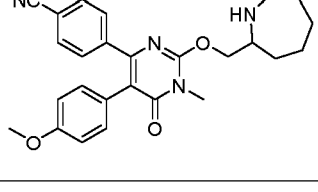
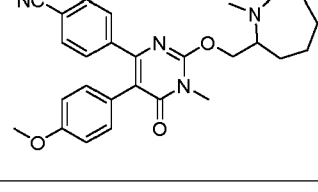
(continuación)

TABLA 2

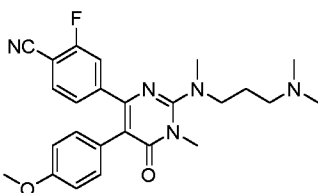
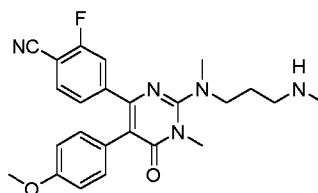
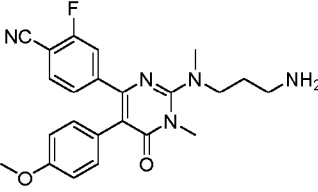
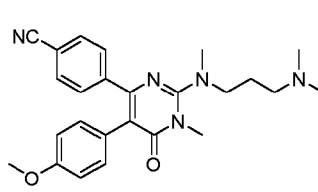
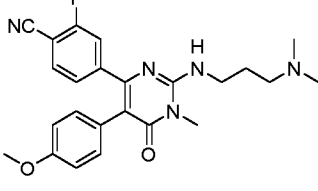
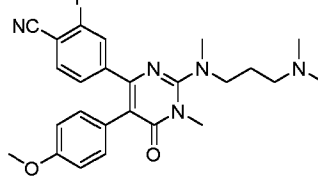
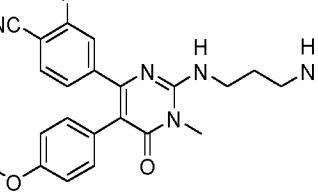
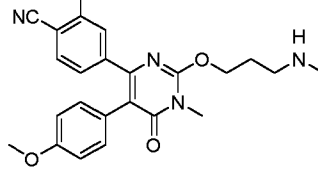
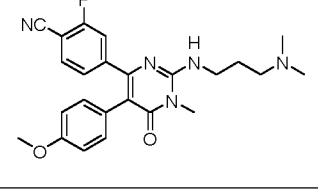
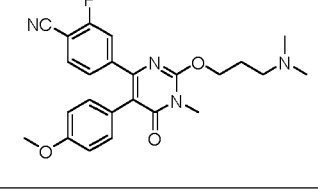
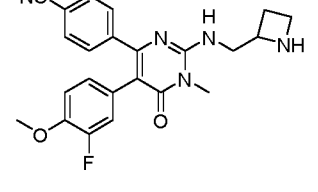
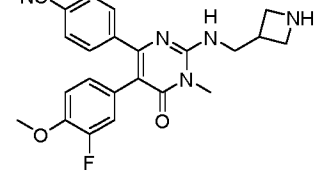
(continuación)

TABLA 2

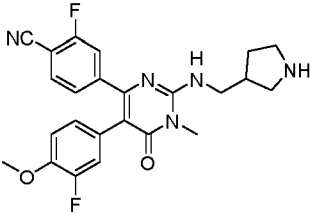
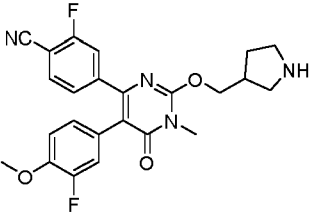
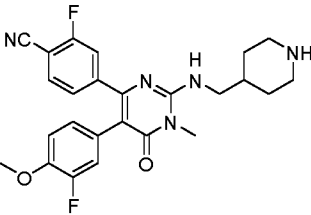
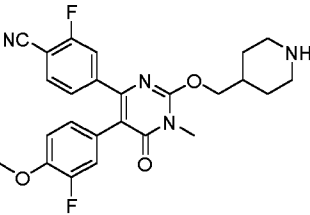
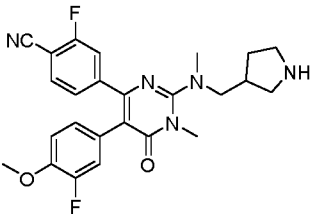
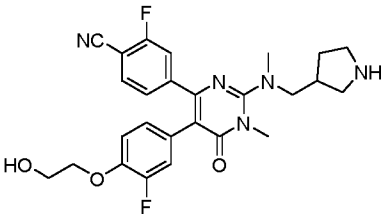
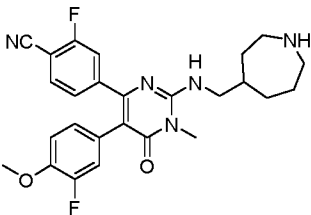
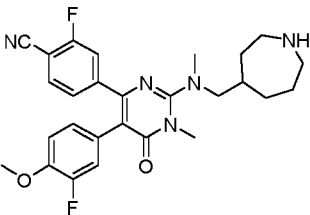
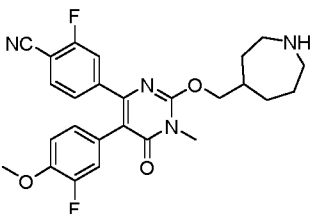
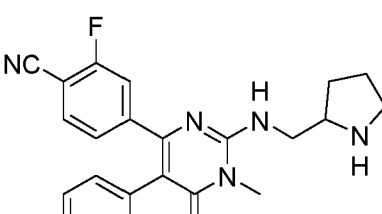
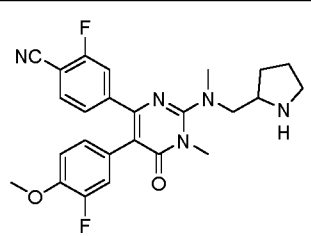
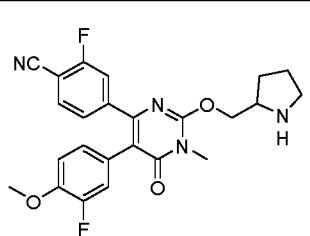
	
	
	
	
	
	

(continuación)

TABLA 2

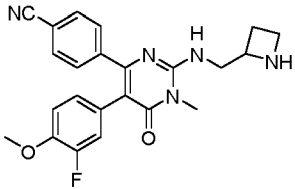
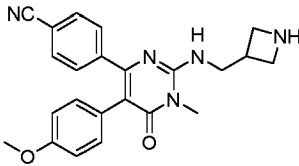
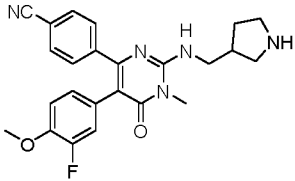
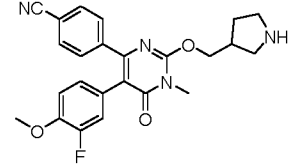
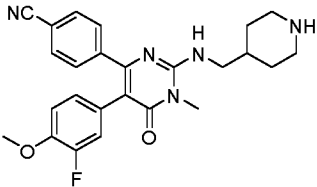
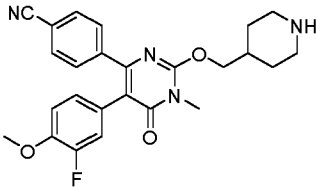
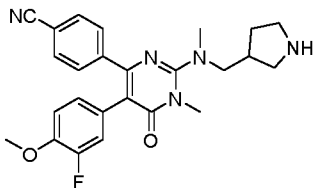
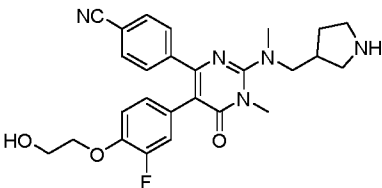
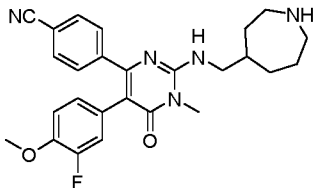
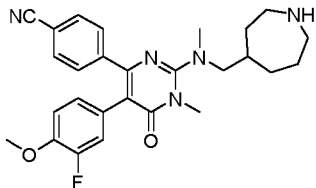
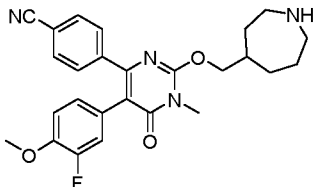
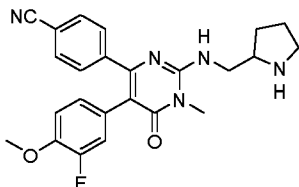
	
	
	
	
	
	

(continuación)

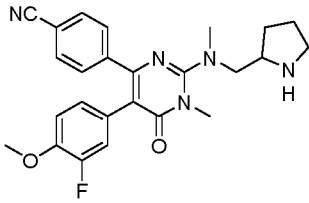
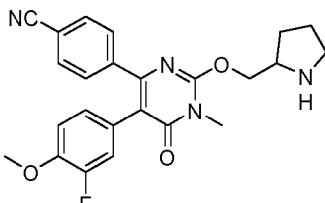
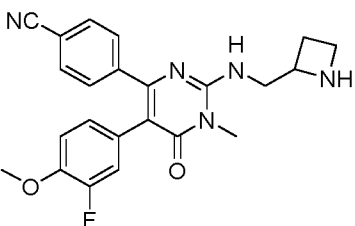
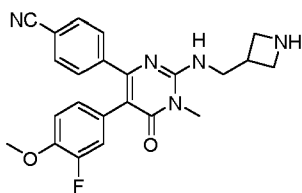
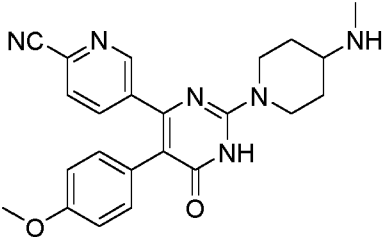
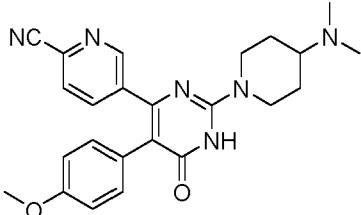
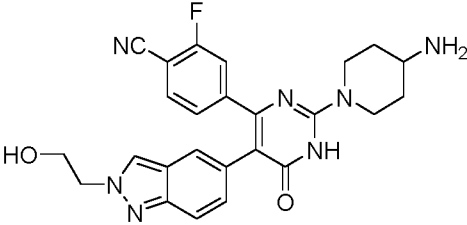
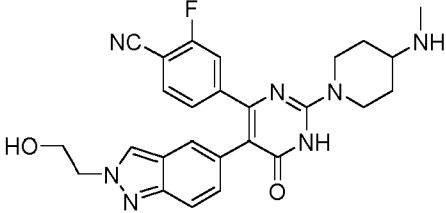
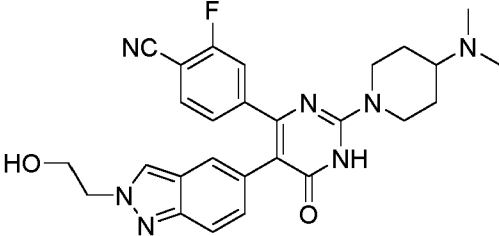
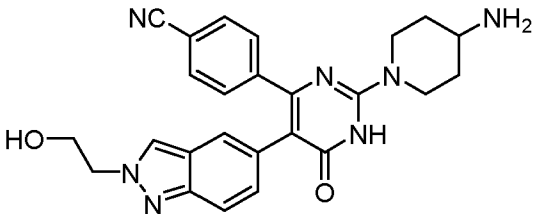
TABLA 2	
	
	
	
	
	
	

(continuación)

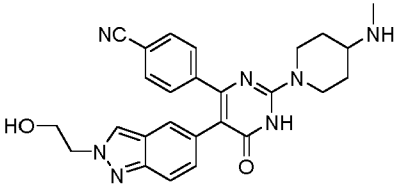
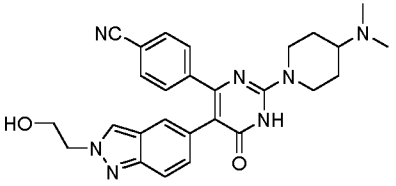
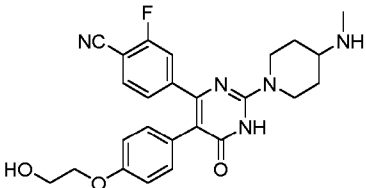
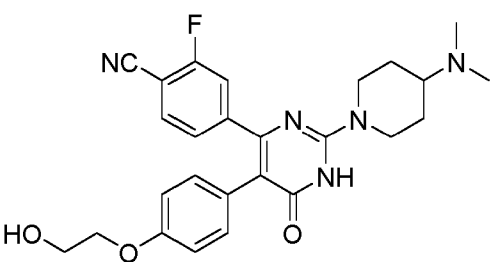
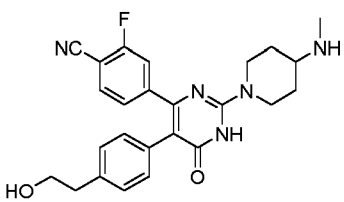
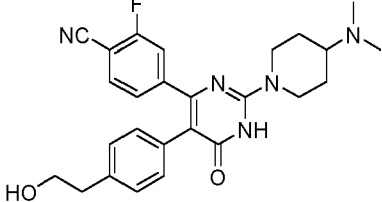
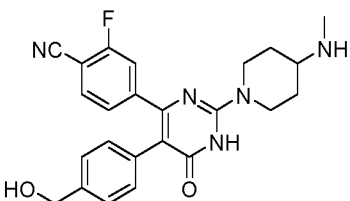
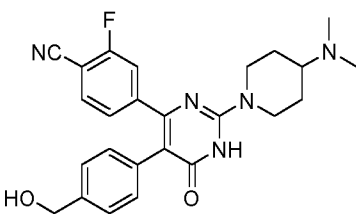
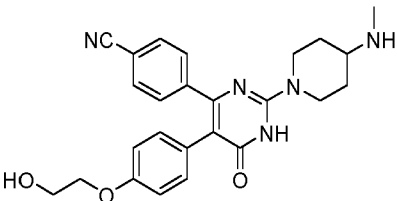
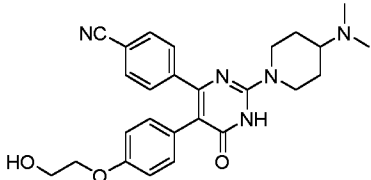
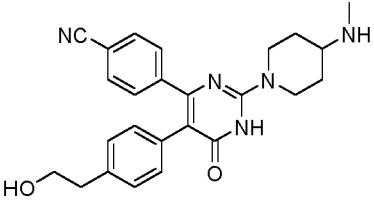
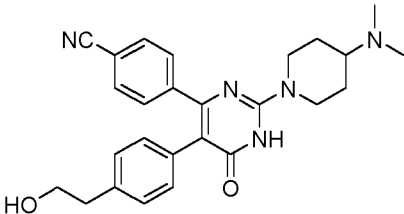
TABLA 2

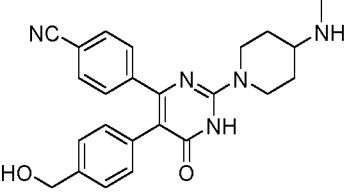
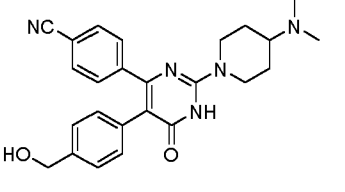
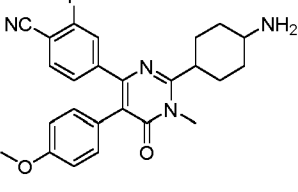
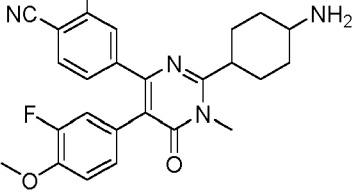
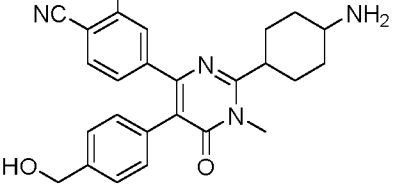
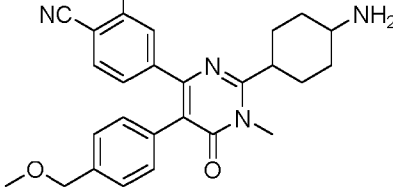
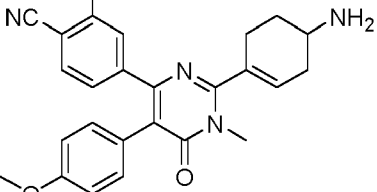
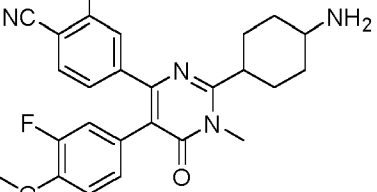
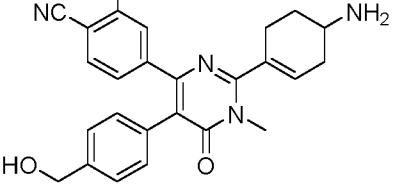
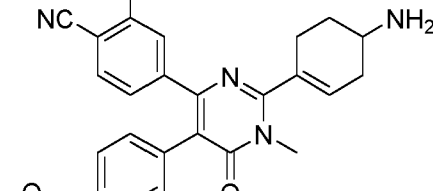
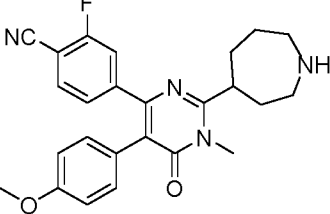
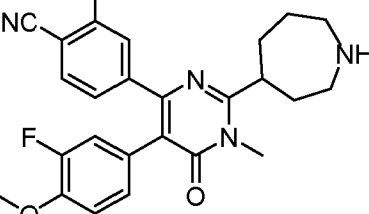
(continuación)

TABLA 2	
	
	
	
	
	

(continuación)

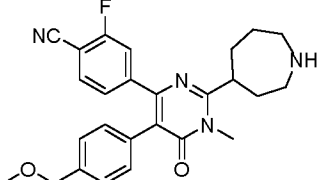
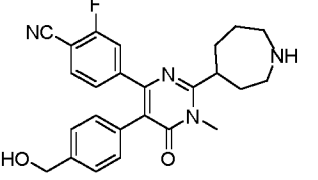
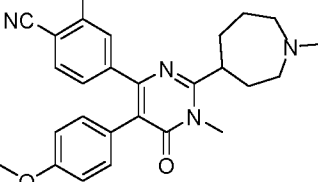
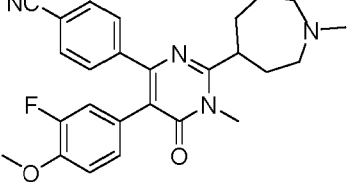
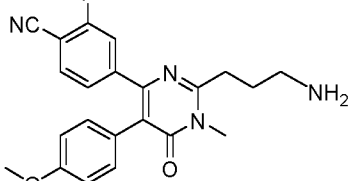
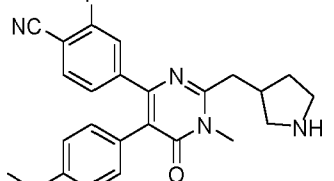
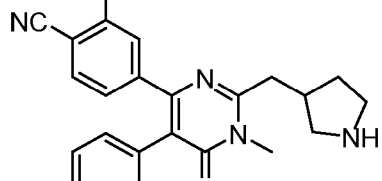
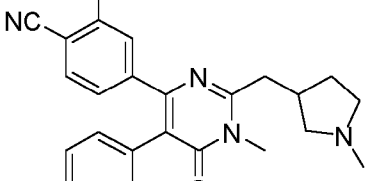
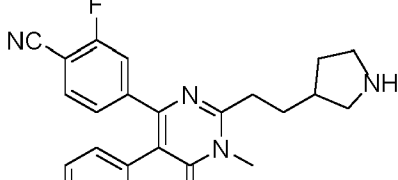
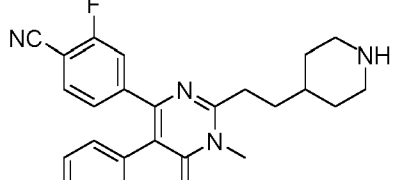
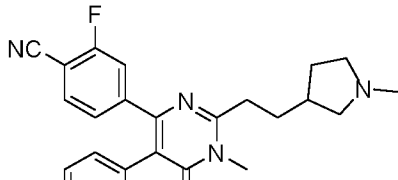
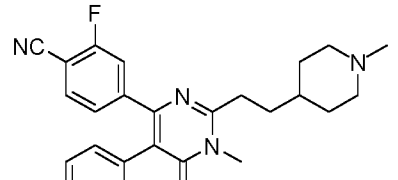
TABLA 2	
	
	
	
	
	
	

(continuación)

TABLA 2	
	
	
	
	
	
	

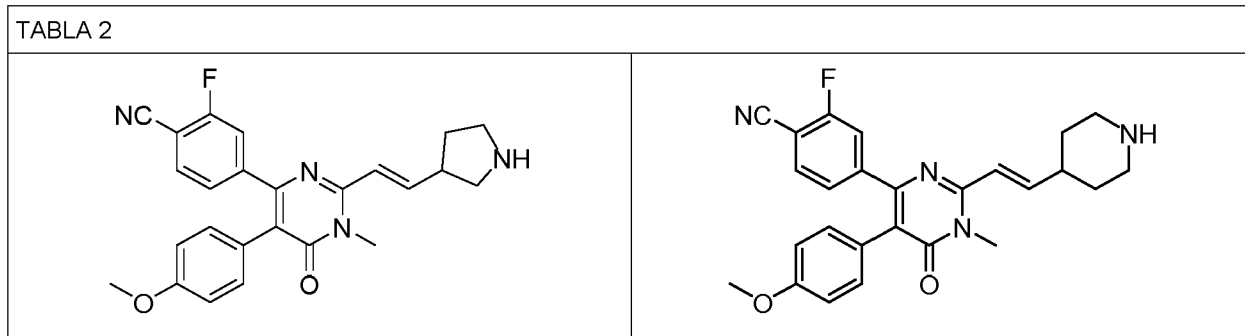
(continuación)

TABLA 2

(continuación)

TABLA 2

*Preparación de los compuestos derivados heterocíclicos sustituidos*

Los compuestos usados en las reacciones descritas en el presente documento se preparan según técnicas de síntesis orgánicas conocidas por los expertos en esta materia, partiendo de productos químicos disponibles en el mercado y/o de compuestos descritos en la bibliografía química. Los "productos químicos disponibles en el mercado" se obtienen de proveedores comerciales que incluyen Acros Organics (Pittsburgh, PA), Aldrich Chemical (Milwaukee, WI, que incluye Sigma Chemical y Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Park, Reino Unido), Avocado Research (Lancashire, Reino Unido), BDH Inc. (Toronto, Canadá), Bionet (Cornwall, Reino Unido), Chemservice Inc. (West Chester, PA), Crescent Chemical Co. (Hauppauge, NY), Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (Rochester, NY), Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, PA), Fisons Chemicals (Leicestershire, Reino Unido), Frontier Scientific (Logan, UT), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA), Key Organics (Cornwall, Reino Unido), Lancaster Synthesis (Windham, NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall, Reino Unido), Parish Chemical Co. (Orem, UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury, CN), Polyorganix (Houston, TX), Pierce Chemical Co. (Rockford, IL), Riedel de Haen AG (Hanover, Alemania), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, NJ), TCI America (Portland, OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville, MD) y Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond, VA).

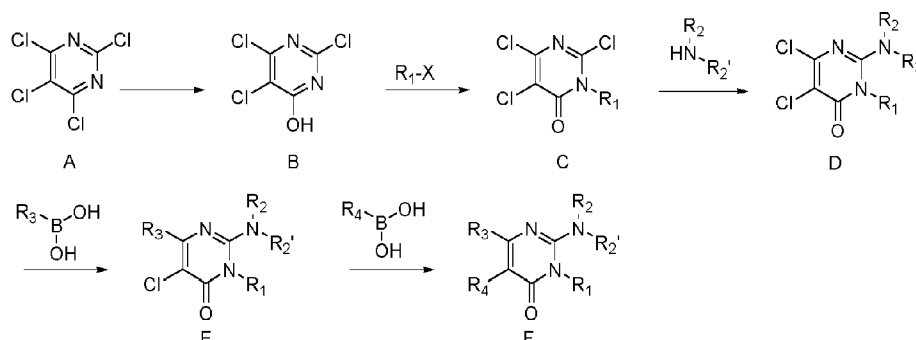
Los libros de referencia y tratados adecuados que detallan la síntesis de reactantes útiles en la preparación de los compuestos descritos en el presente documento, o proporcionan referencias a artículos que describen la preparación, incluyen, por ejemplo, SYNTHETIC ORGANIC CHEMISTRY, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; S. R. Sandler *et al.*, ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS, 2ª ed., Academic Press, Nueva York, 1983; H. O. House, MODERN SYNTHETIC REACTIONS, 2ª ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. Gilchrist, HETEROCYCLIC CHEMISTRY, 2ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1992; J. March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS & STRUCTURE, 4ª ed., Wiley-Interscience, Nueva York, 1992. Otros libros y tratados adecuados que detallan la síntesis de reactivos útiles en la preparación de los compuestos descritos en el presente documento, o que proporcionan referencias a artículos que describen la preparación, incluyen, por ejemplo, Fuhrhop, J. y Penzlin G., ORGANIC SYNTHESIS: CONCEPTS, METHODS, STARTING MATERIALS, SECOND, REVISED & ENLARGED EDITION (1994) John Wiley & Sons ISBN: 3-527-29074-5; Hoffman, R. V., ORGANIC CHEMISTRY, AN INTERMEDIATE TEXT (1996) Oxford University Press, ISBN 0-19-509618-5; Larock, R. C. COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS: A GUIDE TO FUNCTIONAL GROUP PREPARATION, 2ª ed. (1999) Wiley-VCH, ISBN: 0-471-19031-4; March, J. ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS, & STRUCTURE, 4ª ed. (1992) John Wiley & Sons, ISBN: 0-471-60180-2; Otera, J. (ed.), MODERN CARBONYL CHEMISTRY, (2000) Wiley-VCH, ISBN: 3-527-29871-1; Patai, S., PATAI'S 1992 GUIDE TO THE CHEMISTRY OF FUNCTIONAL GROUPS, (1992) Interscience ISBN: 0-471-93022-9; Solomons, T.W.G., ORGANIC CHEMISTRY, 7ª ed. (2000) John Wiley & Sons, ISBN: 0-471-19095-0; Stowell, J. C., INTERMEDIATE Organic Chemistry, 2ª ed. (1993) Wiley-Interscience, ISBN: 0-471-57456-2; INDUSTRIAL ORGANIC CHEMICALS: STARTING MATERIALS & INTERMEDIATES: AN ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA, (1999) John Wiley & Sons, ISBN: 3-527-29645-X, en 8 volúmenes; ORGANIC REACTIONS (1942-2000) John Wiley & Sons, en más de 55 volúmenes; y CHEMISTRY OF FUNCTIONAL GROUPS, John Wiley & Sons, en 73 volúmenes.

Los reactantes específicos y análogos se identifican opcionalmente a través de los índices de productos químicos conocidos preparados por el Chemical Abstract Service de la American Chemical Society, que están disponibles en la mayoría de las bibliotecas públicas y universitarias, así como a través de bases de datos en línea (comuníquese con la American Chemical Society, Washington, DC para más detalles). Los productos químicos que se conocen pero que no están disponibles en el mercado en los catálogos se preparan opcionalmente en empresas de síntesis química personalizada, donde muchas de las empresas de suministro de productos químicos normales (por ejemplo, las enumeradas anteriormente) ofrecen servicios de síntesis personalizada. Una referencia para la preparación y selección de sales farmacéuticas de los compuestos derivados heterocíclicos sustituidos descritos en el presente documento es P. H. Stahl y C. G. Wermuth, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 2002.

Los compuestos derivados heterocíclicos sustituidos se preparan mediante la ruta de síntesis general descrita a

continuación en el esquema 1.

Esquema 1



Con respecto al esquema 1, la molécula A se hidroliza selectivamente para dar la molécula B. La molécula C se obtiene a partir de la N-alkilación de la molécula B con diferentes haluros de alquilo R_1-X . El desplazamiento selectivo de la molécula de tricloruro C se realiza con diferentes aminas $HN(R_2)(R_2')$ en condiciones básicas para formar la molécula D. La molécula E se prepara a partir de la molécula D en condiciones de acoplamiento reticulado mediado por paladio con ácidos borónicos, por ejemplo $R_3-B(OH)_2$, o ésteres borónicos. La molécula F se prepara a partir del compuesto E en condiciones de acoplamiento reticulado mediadas por paladio con ácidos borónicos, por ejemplo, $R_3-B(OH)_2$, o ésteres borónicos.

Composiciones farmacéuticas de los compuestos derivados heterocíclicos sustituidos

En determinadas realizaciones, el compuesto derivado heterocíclico sustituido, como se describe en el presente documento, se administra en forma de un producto químico puro. En otras realizaciones, el compuesto derivado heterocíclico sustituido descrito en el presente documento se combina con un vehículo farmacéuticamente adecuado o aceptable (también denominado en el presente documento, excipiente farmacéuticamente adecuado (o aceptable), excipiente fisiológicamente adecuado (o aceptable) o vehículo fisiológicamente adecuado (o aceptable)) seleccionado en función de una vía de administración elegida y de la práctica farmacéutica habitual, según se describe, por ejemplo, en REMINGTON: THE SCIENCE & PRACTICE OF PHARMACY (Gennaro, 21ª ed. Mack Pub. Co., Easton, Pensilvania (2005)).

En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto derivado heterocíclico sustituido, o un estereoisómero, sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, solvato o N-óxido del mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. El o los vehículos (o excipientes) son aceptables o adecuados si el vehículo es compatible con los otros ingredientes de la composición y no son perjudiciales para el receptor (es decir, el sujeto) de la composición.

Una realización que no forma parte de la presente invención, proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una realización, que no forma parte de la presente invención, proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una realización, que no forma parte de la presente invención, proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En determinadas realizaciones, que no forman parte de la presente invención, el compuesto derivado heterocíclico sustituido, como se describe por la fórmula (I), es sustancialmente puro, ya que contiene menos de aproximadamente el 5 % o menos de aproximadamente el 1 % o menos de aproximadamente el 0,1 %, de otras moléculas pequeñas orgánicas, tales como productos intermedios sin reaccionar o subproductos de síntesis que se crean, por ejemplo, en una o más de las etapas de un método de síntesis.

Las formas farmacéuticas orales adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, sobres o cápsulas de gelatina dura o blanda, metilcelulosa u otro material adecuado de fácil disolución en el tubo digestivo. En algunas realizaciones, se utilizan transportadores sólidos no tóxicos adecuados que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. (Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE & PRACTICE OF PHARMACY (Gennaro, 21ª ed. Mack Pub. Co., Easton, Pensilvania (2005)).

La dosis de la composición, según se describe en el presente documento, difiere, dependiendo del estado del paciente (por ejemplo, ser humano), es decir, el estadio de la enfermedad, el estado general de salud, la edad y otros factores.

Las composiciones farmacéuticas se administran de una manera apropiada para la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). Una dosis apropiada y una duración y frecuencia de administración adecuadas se determinarán por factores tales como el estado del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del principio activo y el método de administración. En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan la composición o composiciones en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico y/o profiláctico (por ejemplo, un resultado clínico mejorado, tal como remisiones completas o parciales más frecuentes, o más tiempo libre de enfermedad y/o de supervivencia global, o una disminución de la gravedad de los síntomas. Las dosis óptimas se determinan generalmente usando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima depende de la masa corporal, del peso o del volumen sanguíneo del paciente.

Las dosis orales normalmente varían de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 1000 mg, de una a cuatro veces, o más, al día.

Uso de los Compuestos Derivados Heterocíclicos Sustituídos

La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en la expresión génica provocados por mecanismos distintos de los de la secuencia de ADN subyacente. Los mecanismos moleculares que desempeñan un papel en la regulación epigenética incluyen la metilación del ADN y las modificaciones de la cromatina/histonas.

Los genomas de organismos eucariotas están sumamente organizados en el núcleo de la célula. Se requiere una extraordinaria compactación para empaquetar los 3 mil millones de nucleótidos del genoma humano en el núcleo de una célula. La cromatina es el complejo de ADN y proteínas que forma los cromosomas. Las histonas son el principal componente proteico de la cromatina, que actúan como carretes alrededor de los cuales se enrolla el ADN. Los cambios en la estructura de la cromatina se ven afectados por modificaciones covalentes de las proteínas histonas y por proteínas de unión distintas de las histonas. Se conocen varias clases de enzimas que modifican las histonas en diversos sitios.

Hay un total de seis clases de histonas (H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5) que se organizan en dos grupos: histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) e histonas enlazadoras (H1 y H5). La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, que consta de aproximadamente 147 pares de bases de ADN enrollados alrededor del octámero de histonas central, que consiste en dos copias de cada una de las histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4.

A continuación, las unidades básicas del nucleosoma se organizan y condensan mediante la agregación y el plegamiento de nucleosomas para formar una estructura de cromatina sumamente condensada. Son posibles una serie de diferentes estados de condensación y la rigidez de la estructura de la cromatina varía durante el ciclo celular, siendo más compacta durante el proceso de división celular.

La estructura de la cromatina desempeña un papel crítico en la regulación de la transcripción génica, que no puede producirse eficazmente a partir de la cromatina sumamente condensada. La estructura de la cromatina está controlada por diversas modificaciones postraduccionales en las proteínas histona, principalmente las histonas H3 y H4, y más comúnmente en las colas de las histonas que se extienden más allá de la estructura central del nucleosoma. Estas modificaciones son acetilación, metilación, fosforilación, ribosilación, sumoilación, ubiquitinación, citrulinación, desimidación y biotilación. El núcleo de las histonas H2A y H3 también puede modificarse. Las modificaciones de las histonas son una parte integral de diversos procesos biológicos, tales como la regulación génica, la reparación del ADN y la condensación de los cromosomas.

La metilación de las histonas es una de las características más importantes de la cromatina; estas desempeñan funciones importantes en la regulación de la transcripción, la respuesta a daños en el ADN, la formación y el mantenimiento de la heterocromatina y la inactivación del cromosoma X. Un reciente descubrimiento también reveló que la metilación de las histonas afectaba al resultado del corte y empalme del pre-ARNm al influir en el reclutamiento de reguladores del corte y empalme. La metilación de histonas incluye mono-, di- y trimetilación de lisinas, y mono-, dimetilación simétrica y dimetilación asimétrica de argininas. Estas modificaciones pueden ser una característica de activación o de represión, dependiendo del lugar y del grado de metilación.

Histona desmetilasas

Una "desmetilasa" o "proteína desmetilasa", como se cita en el presente documento, se refiere a una enzima que elimina al menos un grupo metilo de un polipéptido. Las desmetilasas comprenden un dominio JmjC y puede ser una desmetilasa de metil-lisina o metil-arginina. Algunas desmetilasas actúan sobre las histonas, p. ej., actúan como una desmetilasa de histona H3 o H4. Por ejemplo, una desmetilasa de H3 puede desmetilar una o más de H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 y/o H3K79. Como alternativa, una desmetilasa de H4 puede desmetilar a la histona H4K20. Se conocen desmetilasas que pueden desmetilar un sustrato mono-, di- y/o tri-metilado. Por otra parte, las histona desmetilasas pueden actuar sobre un sustrato de histona central metilada, un sustrato de mononucleosoma, un sustrato de dinucleosoma y/o un sustrato de oligonucleosoma, un sustrato peptídico y/o la cromatina (por ejemplo, en un ensayo basado en células).

La primera lisina desmetilasa descubierta fue la desmetilasa 1 específica de lisina (LSD-1/KDM1), que desmetila H3K4 o H3K9 tanto mono como dimetilada, usando flavina como cofactor. Se predijo una segunda clase de histona desmetilasas que contiene dominio Jumonji C (JmjC), y se confirmó cuando se descubrió una H3K36 desmetilasa usando un ensayo de liberación de formaldehído, que se denominó histona desmetilasa 1 que contiene dominio JmjC (JHDM1/KDM2A).

Posteriormente se identificaron más proteínas que contienen el dominio JmjC y pueden agruparse filogenéticamente en siete subfamilias: JHDM1, JHDM2, JHDM3, JMJD2, JARID, PHF2/PHF8, UTX/UTY y solo el dominio JmjC.

LSD-1

La desmetilasa 1 específica de lisina (LSD-1) es una histona lisina desmetilasa que desmetila específicamente la histona H3 monometilada y dimetilada en K4 y también desmetila la histona H3 dimetilada en K9. Aunque la diana principal de la LSD-1 parece ser las lisinas de las histonas mono y dimetiladas, específicamente H3K4 y H3K9, en algunas referencias se ha demostrado que LSD-1 puede desmetilar las lisinas metiladas en proteínas distintas de histonas, tales como p53, E2F1, Dnmt1 y STAT3.

LSD-1 tiene un grado sustancial de similitud estructural y de identidad/homología de aminoácidos con las poliamina oxidasas y las monoamina oxidasas, todas las cuales (es decir, MAO-A, MAO-B y LSD-1) son amina oxidasas dependientes de flavina que catalizan la oxidación de los enlaces nitrógeno-hidrógeno y/o los enlaces nitrógeno-carbono. La LSD-1 también incluye un dominio SWIRM N-terminal. Existen dos variantes de transcrito de LSD-1 producidas mediante corte y empalme alternativo.

En algunas realizaciones, los compuestos desvelados en el presente documento son capaces de inhibir la actividad de la LSD-1 en una muestra biológica, poniendo en contacto la muestra biológica con un compuesto heterocíclico sustituido como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, un compuesto heterocíclico sustituido, como se desvela en el presente documento, es capaz de modular el nivel de metilación de histona 4 lisina 3 en la muestra biológica. En algunas realizaciones, un compuesto heterocíclico sustituido, como se desvela en el presente documento, es capaz de modular los niveles de metilación de histona 3 lisina 9 en la muestra biológica.

Los compuestos heterocíclicos sustituidos desvelados en el presente documento carecen de actividad inhibitoria significativa de la MAO-A o la MAO-B. En algunas realizaciones, un compuesto heterocíclico sustituido como se desvela en el presente documento, inhibe la actividad inhibitoria de la LSD-1 en mayor medida que la actividad inhibitoria de la MAO-A y/o la MAO-B.

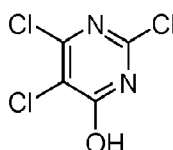
Una realización, que no forma parte de la presente invención, proporciona un método para regular la transcripción génica en una célula, que comprende la inhibición de la actividad de la desmetilasa 1 específica de lisina, exponiendo la enzima desmetilasa 1 específica de lisina a un compuesto de Fórmula (I). Una realización que no forma parte de la presente invención, proporciona un método para regular la transcripción génica en una célula, que comprende la inhibición de la actividad de la desmetilasa 1 específica de lisina, exponiendo la enzima desmetilasa 1 específica de lisina a un compuesto de Fórmula (Ia). Una realización que no forma parte de la presente invención, proporciona un método para regular la transcripción génica en una célula, que comprende la inhibición de la actividad de la desmetilasa 1 específica de lisina, exponiendo la enzima desmetilasa 1 específica de lisina a un compuesto de Fórmula (Ib).

Ejemplos

I. Síntesis química

A menos que se indique lo contrario, los reactivos y disolventes se usaron según se recibieron de los proveedores comerciales. Se usaron disolventes anhidros y cristalería secada al horno para las transformaciones de síntesis sensibles a la humedad y/o el oxígeno. Los rendimientos no se optimizaron. Los tiempos de reacción son aproximados y no se optimizaron. Los análisis por cromatografía en columna y cromatografía en capa fina (TLC) se realizaron sobre gel de sílice, a menos que se indique de otro modo. Los espectros se dan en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento, J se expresan en hercios. Para los espectros de protones, se usó el pico de disolvente como pico de referencia.

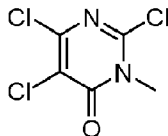
Preparación 1A: 2,5,6-tricloropirimidin-4-ol



A una solución de 2,4,5,6-tetracloropirimidina (5 g, 22,9 mmol) en THF (50 ml) se le añadió NaOH 1 N (31 ml, 31,2 mmol) gota a gota, y la mezcla se agitó hasta el día siguiente a TA. La solución se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con DCM (3x). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron y se concentraron al vacío. Los sólidos se

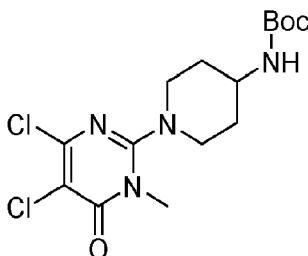
suspendieron en Et₂O durante 30 min a TA, se filtraron, se lavaron con Et₂O y se secaron para dar 3,0 g (66 %) del compuesto del título. [M+H] calc. para C₄HCl₃N₂O, 201; encontrado, 201.

Preparación 1B: 2,5,6-tricloro-3-metil-3-hidropirimidin-4-ona



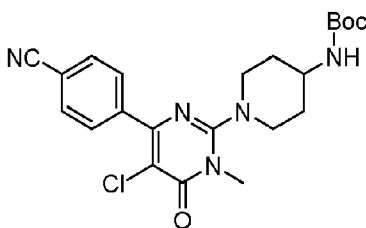
A una mezcla de 2,5,6-tricloropirimidin-4-ol (1 g, 5,0 mmol) y K₂CO₃ (759 mg, 5,5 mmol) en THF (50 ml) a 0 °C se le añadió yodometano (714 mg, 5,0 mmol) gota a gota, y la reacción se agitó a TA hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (EA). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (10:1, PE:EA) para dar 760 mg (71 %) del compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,74 (s, 3H). [M+H] calc. para C₅H₃Cl₃N₂O, 213; encontrado, 213.

Preparación 1C: N-[1-(5,6-dicloro-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-2-il))(4-piperidil)](terc-butoxi)carboxamida



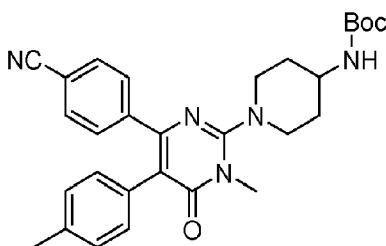
Una solución de 2,5,6-tricloro-3-metil-3-hidropirimidin-4-ona (426 mg, 2,0 mmol), DIEA (536 mg, 4,0 mmol) y piperidin-4-ilcarbamato de terc-butilo (400 mg, 2 mmol) en DMF (10 ml) se calentó a 120 °C durante 1 h. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (1:1, PE:EA) para dar 550 mg (73 %) del compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H), 1,50-1,58 (m, 2H), 2,06-2,10 (m, 2H), 2,98-3,05 (m, 2H), 3,48 (s, 3H), 3,53-3,56 (m, 2H), 3,70 (s, 1H), 4,52 (s, 1H). [M+H] calc. para C₁₅H₂₂Cl₂N₄O₃, 213; encontrado, 213.

Preparación 1D: 1-(5-cloro-4-(4-cianofenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-4-ilcarbamato de terc-butilo



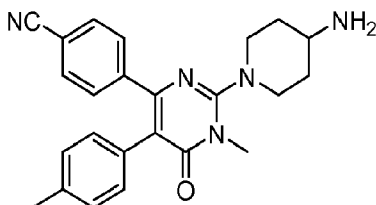
Una mezcla de N-[1-(5,6-dicloro-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-2-il))(4-piperidil)](terc-butoxi)carboxamida (500 mg, 1,3 mmol), ácido 4-cianofenilborónico (195 mg, 1,3 mmol), [1,1'-bis(di-terc-butilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (81 mg, 0,13 mmol) y K₂CO₃ (359 mg, 2,6 mmol) en DMF (10 ml) se lavó abundantemente con nitrógeno y se agitó a 85 °C durante 2 h. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre sílice (1:1, EA:PE) para dar 250 mg (40 %) del compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,45 (s, 9H), 1,54-1,61 (m, 2H), 2,05-2,10 (m, 2H), 2,99-3,05 (m, 2H), 3,48-3,56 (s, 5H), 3,70 (s, 1H), 4,56 (s, 1H), 7,73 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,93 (d, J = 8,0 Hz, 2H). [M+H] calc. para C₂₂H₂₆ClN₅O₃, 444; encontrado, 444.

Preparación 1E: 1-(4-(4-cianofenil)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-4-ilcarbamato de terc-butilo



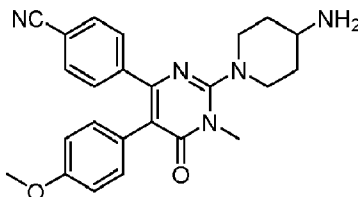
Una mezcla de 1-(5-cloro-4-(4-cianofenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-4-ilcarbamato de *terc*-butilo (200 mg, 0,45 mmol), ácido p-tolilborónico (123 mg, 0,90 mmol), [1,1'-bis(di-*terc*-butilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II) (28 mg, 0,045 mol) y K₂CO₃ (124 mg, 0,90 mmol) en DMF (10 ml) se lavó abundantemente con nitrógeno y se agitó a 85 °C durante 2 h. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (1:1, EA:PE) para dar 50 mg (22 %) del compuesto del título. [M+H]⁺ calc. para C₂₉H₃₃N₅O₃, 500; encontrado, 500.

Ejemplo 1: 4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-4-il]benzonitrilo, sal HCl



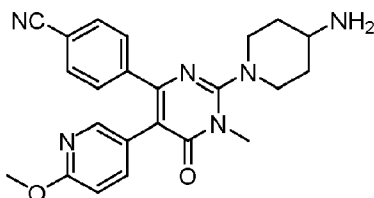
A una solución de 1-(4-(4-cianofenil)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-4-ilcarbamato de *terc*-butilo (50 mg, 0,1 mmol) en EA (10 ml) se le añadió una solución 4 N de HCl en EA (5 ml) y la mezcla se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se concentró al vacío, y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 20 mg (46 %) del compuesto del título en forma de la sal clorhidrato. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,74-1,79 (m, 2H), 2,00-2,04 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 2,96-3,03 (m, 2H), 3,29-3,03 (m, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,71-3,74 (m, 2H), 6,89 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,99 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 2H). [M+H]⁺ calc. para C₂₄H₂₅N₅O, 400; encontrado, 400.

Ejemplo 2: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



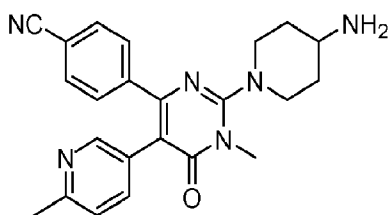
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 5 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,74-1,78 (m, 2H), 2,00-2,03 (m, 2H), 2,98-3,02 (m, 2H), 3,26-3,00 (m, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,70-3,73 (m, 2H), 6,72 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,46 (d, J = 8,0 Hz, 2H). [M+H]⁺ calc. para C₂₄H₂₅N₅O₂, 416; encontrado, 416.

Ejemplo 3: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



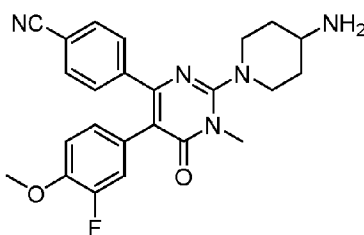
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 11 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,87-1,95 (m, 2H), 2,14-2,17 (m, 2H), 3,15-3,24 (m, 2H), 3,43-3,48 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,93-3,98 (m, 2H), 4,23 (s, 3H), 7,46 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,12 (dd, J = 8,8, 1,6 Hz, 1H), 8,28 (d, J = 2,0 Hz, 1H). [M+H]⁺ calc. para C₂₃H₂₄N₆O₂, 417; encontrado, 417.

Ejemplo 4: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



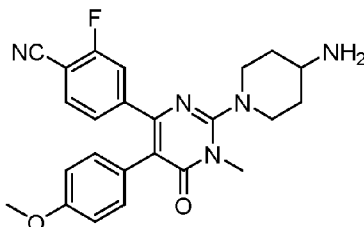
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 4 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,79-1,80 (m, 2H), 2,03-2,05 (m, 2H), 2,66 (s, 3H), 3,04-3,09 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 1H), 3,50 (s, 3H), 3,83-3,88 (m, 2H), 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,58 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,64 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,00 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H), 8,54 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}$, 401; encontrado, 401.

Ejemplo 5: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



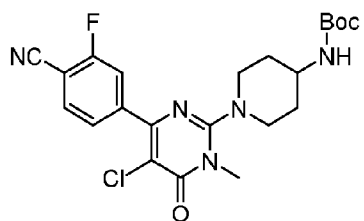
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 7 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,89-1,95 (m, 2H), 2,15-2,18 (m, 2H), 3,14-3,18 (m, 2H), 3,44-3,46 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,88-3,90 (m, 5H), 6,79 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,96-7,02 (m, 2H), 7,54 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,64 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{FN}_6\text{O}_2$, 434; encontrado, 434.

Ejemplo 6: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 5 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,83-1,89 (m, 2H), 2,10-2,13 (m, 2H), 3,05-3,11 (m, 2H), 3,35-3,38 (m, 1H), 3,55 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,77-3,82 (m, 2H), 6,84 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,04 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,21 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,53-7,56 (m, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{FN}_6\text{O}_2$, 434; encontrado, 434.

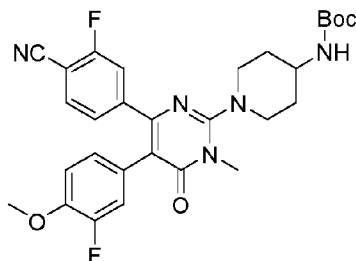
Preparación 7A: 1-(5-cloro-4-(3-fluoro-4-cianofenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-4-ilcarbamato de *terc*-butilo



Una mezcla de N-[1-(5,6-dicloro-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-2-il))(4-piperidil)](*terc*-butoxi)carboxamida (150 g, 0,40 mol), ácido 3-fluoro-4-cianofenilborónico (65,8 g, 0,40 mol), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (9,3 g, 8 mmol) y Na_2CO_3 0,4 N (2 l, 0,80 mol) en ACN (4 l) se lavó abundantemente con nitrógeno y se agitó a 85 °C durante 2 h. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se lavaron con salmuera, se secaron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre sílice (1:1, EA:PE) para dar 95 g (57 %) del compuesto del título. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,45 (s, 9H), 1,54-1,61 (m, 2H), 2,05-2,13 (m,

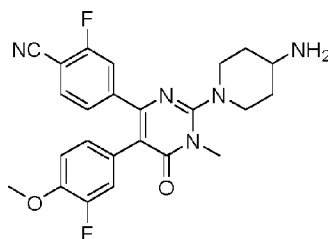
2H), 2,99-3,08 (m, 2H), 3,53-3,58 (s, 5H), 3,70 (s, 1H), 4,54 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 7,68-7,80 (m, 3H).

Preparación 7B: N-[1-[4-(4-ciano-3-fluorofenil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-2-il]piperidin-4-il]carbamato de *tert*-butilo



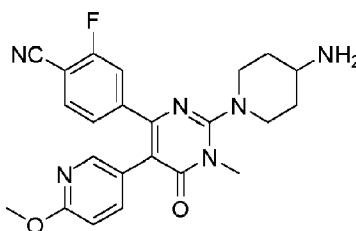
Una mezcla de (*tert*-butoxi)-N-[1-[5-cloro-6-(4-ciano-3-fluorofenil)-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-2-il)](4-piperidil)]carboxamida (1 g, 2,169 mmol), ácido 3-fluoro-4-metoxibencenoborónico (740 mg, 4,338 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (480 mg, 0,651 mmol) y Na₂CO₃ (690 mg, 6,51 mmol) en dioxano:H₂O (3:1, 15 ml) se lavó abundantemente con nitrógeno, se tapó y se agitó a 145 °C durante 2 h en el microondas. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por FC (1:1, EA:PE) para dar 800 mg (71 %) del compuesto del título. [M+H]⁺ calc. para C₂₉H₃₁F₂N₅O₄, 552; encontrado, 552. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 1,46 (s, 9H), 1,60 (d, $J = 10,11$ Hz, 2H), 2,11 (d, $J = 11,62$ Hz, 2H), 3,06 (t, $J = 12,00$ Hz, 2H), 3,54 (s, 3H), 3,60 (d, $J = 13,64$ Hz, 2H), 3,72 (s a, 1H), 3,88 (s, 3H), 4,52 (s a, 1H), 6,79-6,89 (m, 2H), 6,97 (d, $J = 12,38$ Hz, 1H), 7,13 (d, $J = 8,34$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 9,85$ Hz, 1H), 7,42 (s a, 1H).

Ejemplo 7: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo (Compuesto A)



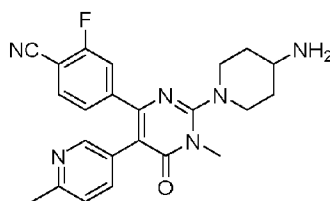
A una solución de N-[1-[4-(4-ciano-3-fluorofenil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-2-il]piperidin-4-il]carbamato de *tert*-butilo (5,2 g, 9,44 mmol) en EA (20 ml) se le añadió HCl 1 N en EA (30 ml). La mezcla se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se concentró al vacío para dar el producto del título en forma de la sal HCl (4,05 g, 88 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,77-1,79 (m, 2H), 2,02-2,04 (m, 2H), 2,99-3,04 (m, 2H), 3,26-3,00 (m, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,73-3,75 (m, 2H), 6,67-6,68 (m, 1H), 6,84-6,95 (m, 2H), 7,12-7,14 (m, 1H), 7,24-7,36 (m, 1H), 7,46-7,50 (m, 1H). [M+H]⁺ calc. para C₂₄H₂₃F₂N₅O₂, 452; encontrado, 452.

Ejemplo 8: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



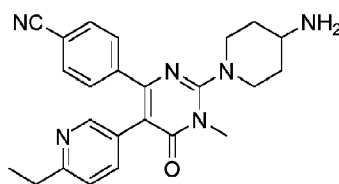
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 6 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,79-1,83 (m, 2H), 2,02-2,06 (m, 2H), 3,04-3,11 (m, 2H), 3,21-3,22 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,81-3,85 (m, 2H), 4,12 (s, 3H), 7,22-7,24 (m, 1H), 7,38 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 7,57-7,61 (m, 1H), 8,04-8,07 (m, 1H), 8,21 (s, 1H). [M+H]⁺ calc. para C₂₃H₂₃FN₆O₂, 435; encontrado, 435.

Ejemplo 9: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



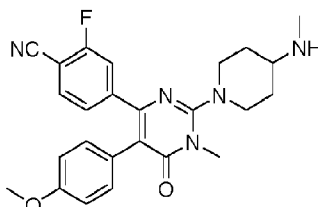
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 8 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,92-1,96 (m, 2H), 2,16-2,19 (m, 2H), 2,80 (s, 3H), 3,19-3,25 (m, 2H), 3,45-3,49 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,96-3,99 (m, 2H), 7,34 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,71 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,80 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,18 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,71 (s, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{FN}_6\text{O}$, 419; encontrado, 419.

Ejemplo 10: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-yl)-5-(6-etil-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



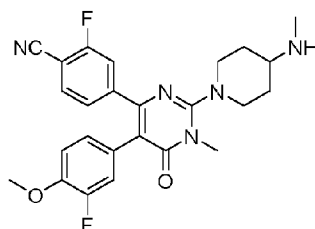
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 7 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,30 (t, $J = 4,0$ Hz, 3H), 1,83-1,88 (m, 2H), 2,06-2,09 (m, 2H), 2,96-2,99 (m, 2H), 3,09-3,16 (m, 2H), 3,26-3,31 (m, 1H), 3,51 (s, 3H), 3,86-3,89 (m, 2H), 7,35 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,61 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,08 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,57 (s, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$, 415; encontrado, 415.

Ejemplo 11: 2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



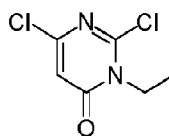
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 7 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,80-1,90 (m, 2H), 2,19-2,23 (m, 2H), 2,75 (s, 3H), 3,06-3,12 (m, 2H), 3,32-3,36 (m, 1H), 3,56 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,84-3,87 (m, 2H), 6,84 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,22 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,36 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 8,54-7,58 (m, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{FN}_5\text{O}_2$, 448; encontrado, 448.

Ejemplo 12: 2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo



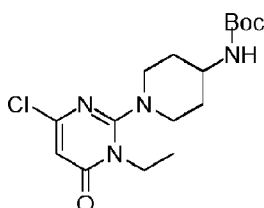
El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 7 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,78-1,88 (m, 2H), 2,17-2,20 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 3,05-3,11 (m, 2H), 3,30-3,35 (m, 1H), 3,54 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,83-3,86 (m, 2H), 6,76 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,93-6,99 (m, 2H), 7,20 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 8,55-7,589 (m, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_2$, 466; encontrado, 466.

Preparación 13A: 2,6-dicloro-3-etil-3H-pirimidin-4-ona



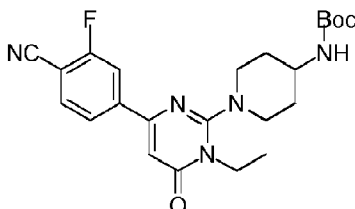
Una solución de 2,6-dicloro-pirimidin-4-ol (1,0 g, 6,1 mmol) y K_2CO_3 (1,1 g, 7,9 mmol) en DMF (10 ml) se agitó a TA durante 15 min. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, y se añadió yodoetano (1,1 ml, 6,7 mmol) gota a gota. Después de agitar hasta el día siguiente a TA, la mezcla de reacción se diluyó con EA, se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (20:1, EA:PE) para dar 330 mg (28 %) del compuesto del título. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,37 (t, J = 7,6 Hz, 3H), 4,76 (c, J = 6,8 Hz, 2H), 6,67 (s, 1H). [M+H] calc. para $C_8H_6Cl_2N_2O$, 193, 195, 197; encontrado, 193, 195, 197.

Preparación 13B: éster *tert*-butílico del ácido [1-(4-cloro-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-piperidin-4-il]-carbámico



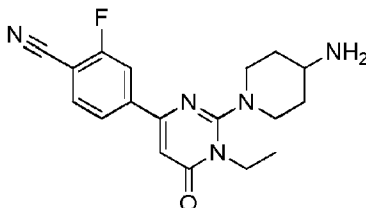
Una solución de 2,6-dicloro-3-etil-3H-pirimidin-4-ona (320 mg, 1,64 mmol), DIEA (423 mg, 3,28 mmol) y (*tert*-butoxi)-N-(4-piperidil)carboxamida (328 mg, 1,64 mmol) en DMF (10 ml) se calentó a 120 °C durante 1 h. El disolvente se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de sílice (1:5, EA:PE) para dar 210 mg (36 %) del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,25-1,32 (m 2H), 1,35 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,96-2,02 (m, 2H), 2,98-3,06 (m, 2H), 3,70 (a, 1H), 4,30 (c, J = 5,2 Hz, 2H), 4,44 (a, 1H), 4,57-4,61 (m, 2H), 5,95 (s, 1H). [M+H] calc. para $C_{16}H_{25}ClN_4O_3$, 357, 359; encontrado, 357, 359.

Preparación 13C: Éster *tert*-butílico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



Una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido [1-(4-cloro-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-piperidin-4-il]-carbámico (210 mg, 0,59 mmol) en CH_3CN (10 ml), ácido 3-fluoro-4-cianofenilborónico (126 mg, 0,77 mmol), $Pd(PPh)_4$ (14 mg, 0,012 mmol) y Na_2CO_3 0,4 M (4,5 ml, 1,77 mmol) se agitó a 90 °C hasta el día siguiente en atmósfera de N_2 . El producto orgánico se concentró al vacío y el acuoso se extrajo con DCM (2x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (1:2, EA:PE) para dar 185 mg (64 %) del compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo. [M+H] calc. para $C_{23}H_{28}FN_5O_3$, 442; encontrado, 442.

Ejemplo 13: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo

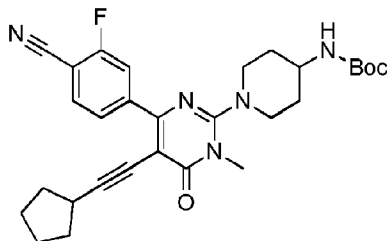


A una mezcla de éster *tert*-butílico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (180 mg, 0,41 mmol) en EA (5 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en EA (3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. El disolvente se evaporó al vacío para dar 150 mg del compuesto del título (97 %) en forma de un sólido de color amarillo (sal HCl). RMN 1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,28 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 1,48-1,52 (m, 2H), 1,99-2,02 (m, 2H), 2,94-3,01 (m, 2H), 3,33-3,38 (m, 1H), 6,81 (c, J = 6,8 Hz, 2H), 4,85-4,88 (m, 2H),

6,95 (s, 1H), 7,73 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,90-7,95 (m, 2H). $[M+H]^+$ calc. para $C_{18}H_{20}FN_5O$, 342; encontrado, 342.

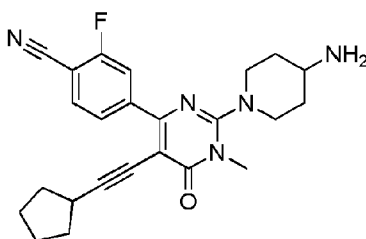
Preparación 14A: éster *tert*-butílico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-ciclopentiletinil-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico

5



Una mezcla de 1-(5-cloro-4-(3-fluoro-4-cianofenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-4-ilcarbamato de *tert*-butilo (200 mg, 0,43 mmol), etinil-ciclopentano (82 mg, 0,87 mmol), $Pd(MeCN)_2Cl_2$ (4,5 mg, 0,017 mmol), X-Phos (10 mg, 0,022 mmol) y K_2CO_3 (120 mg, 0,87 mmol) en ACN (15 ml) se agitó hasta el día siguiente a 95 °C en un tubo cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se enfrió a TA y el disolvente se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (1:2, EA:PE) para dar 100 mg (45 %) del compuesto del título. $[M+H]^+$ calc. para $C_{29}H_{34}FN_5O_3$, 519; encontrado, 519.

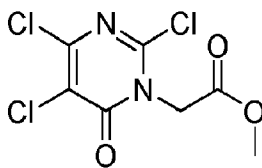
15 Ejemplo 14: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-ciclopentiletinil-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



El compuesto del título se preparó en forma de la sal clorhidrato con un rendimiento total del 70 % según el procedimiento general para la preparación del ejemplo 1. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1,50-1,74 (m, 8H), 1,94-1,99 (m, 4H), 2,88-3,01 (m, 4H), 3,51 (s, 3H), 3,60 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 7,63-7,67 (m, 1H), 8,07-8,11 (m, 2H). $[M+H]^+$ calc. para $C_{24}H_{26}FN_5O$, 419; encontrado, 419.

Preparación 15A: éster metílico del ácido (2,4,5-tricloro-6-oxo-6H-pirimidin-1-il)-acético

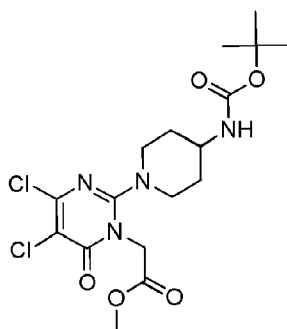
25



A una solución de 2,5,6-tricloro-3H-pirimidin-4-ona (20,0 g, 0,1 mol) en DMF (150 ml) se le añadió NaH (al 60 % en aceite mineral, 6,0 g, 0,12 mol) en porciones a 0 °C y la mezcla se agitó durante 30 min. Después se añadió éster metílico del ácido bromoacético (18,3 g, 0,12 mol) y la mezcla de reacción se agitó a TA hasta el día siguiente. La solución se diluyó con agua (800 ml) y se extrajo con EA (200 ml, 3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (800 ml, 3x), se lavaron con salmuera (500 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (1:50, EA:PE) para dar 6,0 g del producto del título (22 %). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3,80 (s, 3H), 5,04 (s, 2H). $[M+H]^+$ calc. para $C_7H_5Cl_3N_2O_3$, 271; encontrado, 271.

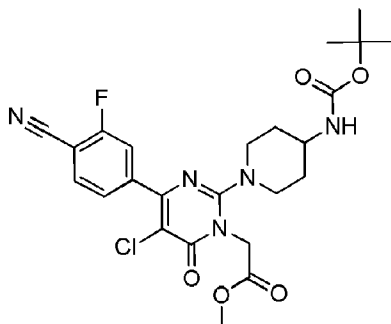
35

Preparación 15B: éster metílico del ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-4,5-dicloro-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético



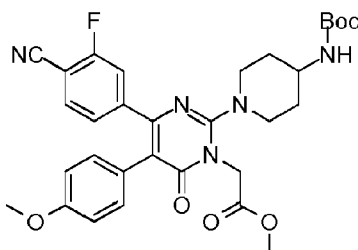
A una solución de éster metílico del ácido (2,4,5-tricloro-6-oxo-6H-pirimidin-1-il)-acético (6,0 g, 22,4 mmol) y éster *tert*-butílico del ácido piperidin-4-il-carbámico (4,9 g, 24,4 mmol) en DMF (50 ml) se le añadió DIPEA (5,7 g, 44,3 mmol) gota a gota a TA y la mezcla se agitó hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua (500 ml) y los sólidos se recogieron por filtración. Los sólidos se disolvieron después en DCM (100 ml), se lavaron con agua (100 ml, 3x), se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (1:2 a 1:1, DCM:PE) para dar 6,3 g del producto del título (64 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,22-1,34 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,97-2,03 (m, 2H), 2,96-3,09 (m, 2H), 3,68-3,69 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 4,42-4,44 (m, 3H), 4,84 (s, 2H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5$, 435; encontrado, 435.

Preparación 15C: éster metílico del ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-5-cloro-4-(4-ciano-3-fluorofenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético



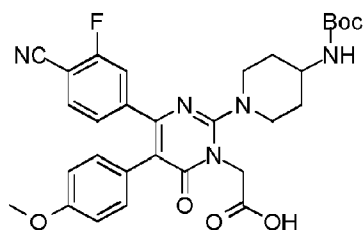
Una mezcla de éster metílico del ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-4,5-dicloro-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético (5,76 g, 13,2 mmol), ácido 4-ciano-3-fluoro bencenoborónico (2,24 g, 16,1 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (306 mmol, 0,26 mmol) y Na_2CO_3 (2,8 g, 26,5 mmol) en DMF:H $_2$ O (50 ml:10 ml) se agitó a 65 °C hasta el día siguiente en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por cromatografía sobre sílice (1:20 a 1:0, EA:PE) para dar 2,4 g del producto del título (43 %). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,27-1,37 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,99-2,02 (m, 2H), 2,99-3,06 (m, 2H), 3,68-3,76 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 4,42-4,52 (m, 3H), 4,90 (s, 2H), 7,63-7,66 (m, 1H), 7,67-7,71 (m, 2H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{ClF}_2\text{N}_5\text{O}_5$, 520; encontrado, 520.

Preparación 15D: éster metílico del ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluorofenil)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético



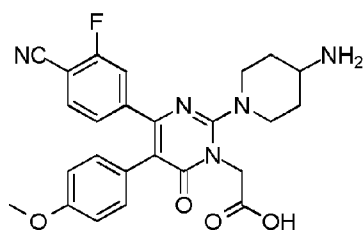
Una solución de éster metílico del ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-5-cloro-4-(4-ciano-3-fluorofenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético (2,2 g, 4,2 mmol), ácido *p*-metoxiborónico (1,9 g, 12,7 mmol), Pd-118 (274 mg, 0,42 mmol) y K_2CO_3 (1,2 g, 8,4 mmol) en DMF (50 ml) se agitó a 145 °C durante 6 h en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 600 mg del producto del título (24 %). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{FN}_5\text{O}_6$, 592; encontrado, 592.

Preparación 15E: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-ciclopropilmetil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



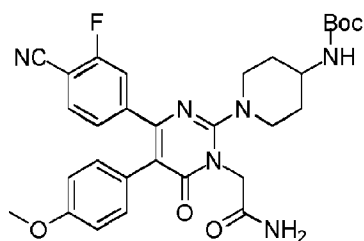
- 5 A una solución de éster metílico del ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético (600 mg, 1,02 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió una solución 2 N de NaOH (5 ml). Después de que se completara la reacción, la solución se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 240 mg del producto del título en forma de un sólido de color amarillo (41 %).
- 10 [M+H] calc. para C₃₀H₃₂FN₅O₆, 578; encontrado, 578.

Ejemplo 15: ácido [2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético



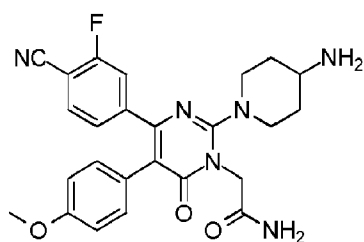
- 15 A una solución de ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético (100 mg, 0,15 mmol) en EA (10 ml) se le añadió una solución 5 N de HCl en EA (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y el disolvente se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 25 mg del producto del título en forma de la sal HCl (32 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,53-1,56 (m, 2H), 2,00-2,03 (m, 2H), 3,00-3,07 (m, 2H), 3,35-3,39 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 4,70 (s, 2H), 4,76-4,77 (m, 2H), 6,74 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,17 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 7,50 (dd, J = 7,2, 8,0 Hz, 1H). [M+H] calc. para C₂₅H₂₄FN₅O₄, 478; encontrado, 478.

- 25 Preparación 16A: éster *tert*-butílico del ácido {1-[1-carbamoylmetil-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



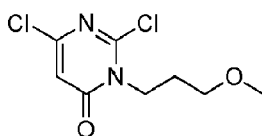
- 30 A una solución de ácido [2-(4-*tert*-butoxicarbonilamino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético (120 mg, 0,2 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió NH₄Cl (17 mg, 0,3 mmol), HATU (95 mg, 0,25 mmol) y DIEA (25 mg, 0,4 mmol). Después de que se completara la reacción, la solución se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM durante (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 50 mg del producto del título en forma de un sólido de color amarillo (43 %).
- 35 [M+H] calc. para C₃₀H₃₃FN₅O₅, 577; encontrado, 577.

Ejemplo 16: 2-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acetamida



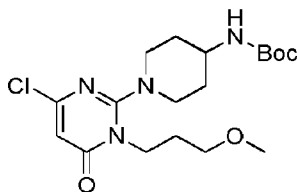
El compuesto del título se preparó en la forma de la sal clorhidrato con un rendimiento del 96 % según el procedimiento para la preparación del ejemplo 15. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,49-1,53 (m, 2H), 1,98-2,01 (m, 2H), 2,97-3,04 (m, 2H), 3,33-3,36 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 4,69 (s, 2H), 4,75-4,78 (m, 2H), 6,75 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,99 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,16 (dd, $J = 1,2, 8,0$ Hz, 1H), 7,25 (dd, $J = 0,8, 10,4$ Hz, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,2, 8,0$ Hz, 1H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{FN}_6\text{O}_3$, 477; encontrado, 477.

Preparación 17A: 2,6-dicloro-3-(3-metoxi-propil)-3H-pirimidin-4-ona



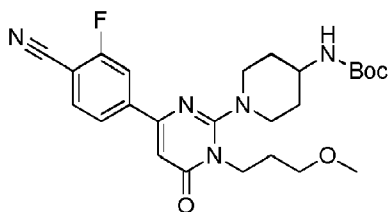
A una solución de 2,6-dicloro-3H-pirimidin-4-ona (600 mg, 3,65 mmol) en DMF (10 ml) se le añadió K_2CO_3 (1,0 g, 7,3 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 10 min. Después se añadió 1-bromo-3-metoxi-propano (101 mg, 7,3 mmol) gota a gota a 0°C y la mezcla se agitó a TA hasta el día siguiente. La DMF se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía de sílice para dar 400 mg del compuesto del título (47 %). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para; calc. para $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$, 237; encontrado, 237.

Preparación 17B: éster *terc*-butílico del ácido {1-[4-cloro-1-(3-metoxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



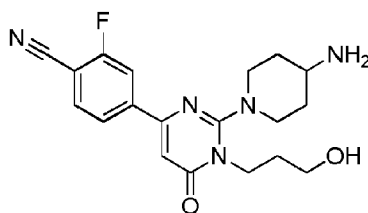
Una solución de 2,6-dicloro-3-(3-metoxi-propil)-3H-pirimidin-4-ona (400 mg, 1,68 mmol), éster *terc*-butílico del ácido piperidin-4-il-carbámico (405 mg, 2 mmol) y DIEA (260 mg, 2,0 mmol) en DMF (20 ml) se agitó a 85°C durante 2 h. El disolvente se concentró y el residuo se purificó por cromatografía de sílice para dar 500 mg del compuesto del título (75 %). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{ClN}_4\text{O}_4$, 400; encontrado, 400.

Preparación 17C: éster *terc*-butílico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-(3-metoxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



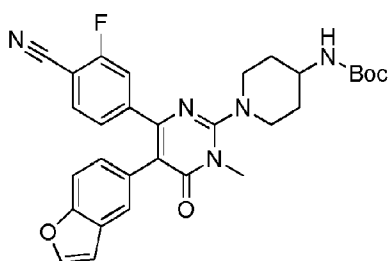
Una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido {1-[4-cloro-1-(3-hidroxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (200 mg, 0,5 mmol), ácido 4-ciano-3-fluorofenilbórico (107 mg, 0,65 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (12 mg, 0,01 mmol) y solución 0,4 M de Na_2CO_3 (4 ml) en ACN se agitó a 85°C hasta el día siguiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EA (3x). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y el disolvente se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía de sílice para dar 240 mg del producto del título (99 %). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{FN}_5\text{O}_4$, 485; encontrado, 485.

Ejemplo 17: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-(3-hidroxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



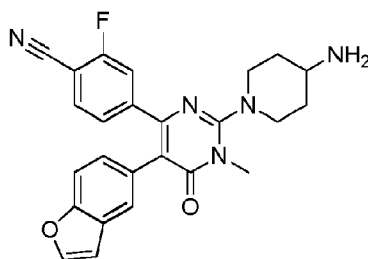
A una solución de éster *terc*-butilico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-(3-metoxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (200 mg, 0,41 mmol) en DCM se le añadió BBr₃ 1 M (4 ml) a -78 °C. La mezcla se agitó a TA durante 2 h y se inactivó a 0 °C con MeOH. La solución se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado. La capa orgánica se secó y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 35 mg del producto del título en la forma de la sal clorhidrato (23 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): 1,65-1,69 (m, 2H), 1,97-2,19 (m, 4H), 3,13-3,22 (m, 2H), 3,48-3,55 (m, 1H), 3,73 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,55 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,94-4,95 (m, 2H), 6,71 (s, 1H), 7,88-8,05 (m, 3H). [M+H]⁺ calc. para C₁₉H₂₂FN₅O₂, 371; encontrado, 371.

Preparación 18A: éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-benzofuran-5-il-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



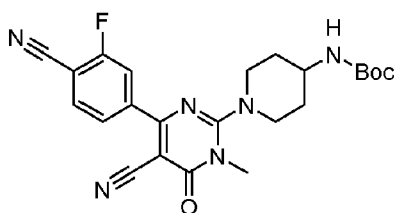
Una mezcla de éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-cloro-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (200 mg, 0,45 mmol), ácido benzofuran-5-borónico (120 mg, 0,68 mmol), Pd(PPh₃)₄ (26 mg, 0,05 mmol) y Na₂CO₃ 2 M (0,9 ml) en 1,4-dioxano (200 ml) se calentó a reflujo hasta el día siguiente en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía de sílice para dar 100 mg del producto del título (42 %). [M+H]⁺ calc. para C₃₀H₃₀FN₅O₄, 543; encontrado, 543.

Ejemplo 18: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-benzofuran-5-il-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



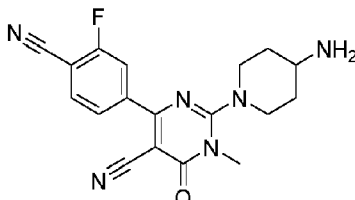
A una solución de la preparación 18A (60 mg, 0,11 mmol) en EA (20 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en EA (10 ml). La mezcla se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se concentró al vacío para dar 43 mg del producto del título en la forma de la sal clorhidrato (53 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): 1,85-1,92 (m, 2H), 2,13-2,18 (m, 2H), 3,10 (t, *J* = 4,0 Hz, 2H), 3,31-3,33 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,87 (d, *J* = 13,2 Hz, 2H), 6,65-7,21 (m, 3H), 7,38-7,76 (m, 4H), 7,76 (s, 1H). [M+H]⁺ calc. para C₂₅H₂₂FN₅O₂, 443; encontrado, 443.

Preparación 19A: éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-ciano-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



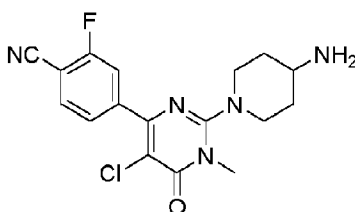
Una mezcla de éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-cloro-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (460 mg, 1 mmol), $\text{Zn}(\text{CN})_2$ (175 mg, 1,5 mmol) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (116 mg, 0,0,1 mmol) en DMF (5 ml) se agitó durante 4 h a 150 °C en atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se enfrió a TA y se filtró. El filtrado se concentró al vacío, y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 150 mg del producto del título en forma de un sólido de color amarillo (33 %). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{FN}_6\text{O}_3$, 453; encontrado, 453.

Ejemplo 19: 2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-carbonitrilo



A una solución de éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-ciano-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (150 mg, 0,33 mmol) en EA (5 ml) se le añadió una solución 5 N de HCl en EA (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y el disolvente se concentró al vacío para dar 120 mg del producto del título en forma de la sal HCl (94 %). RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,67-1,72 (m, 2H), 2,02-2,06 (m, 2H), 3,13-3,16 (m, 2H), 3,34-3,38 (m, 1H), 3,42 (s, 3H), 3,98-4,02 (m, 2H), 7,82-7,90 (m, 3H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_6\text{O}$, 353; encontrado, 353.

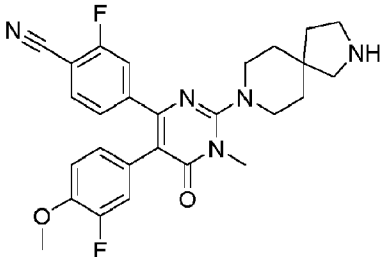
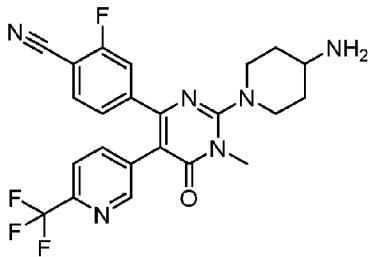
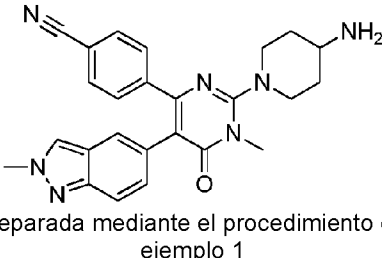
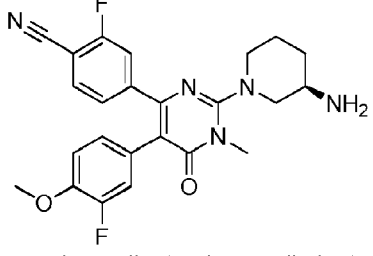
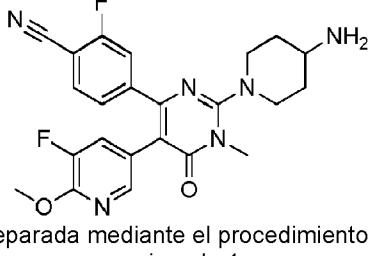
Ejemplo 20: 4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-cloro-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo



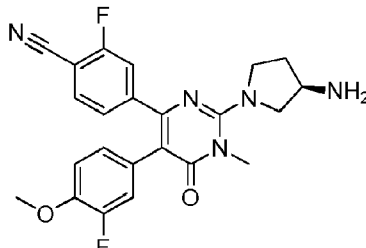
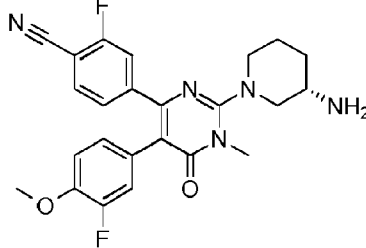
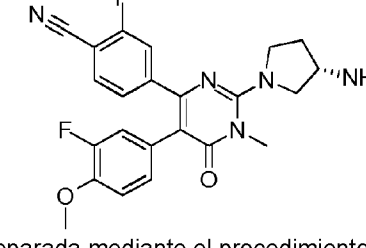
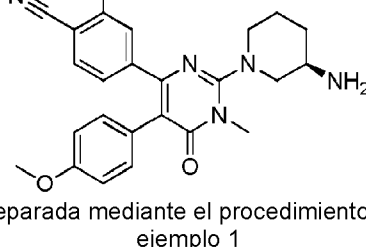
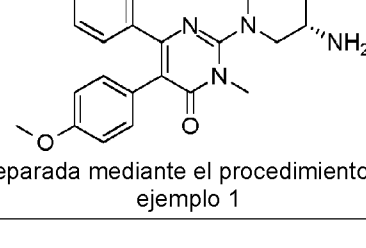
A una solución de éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-cloro-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (150 mg, 0,33 mmol) en EA (5 ml) se le añadió una solución 5 N de HCl en EA (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y el disolvente se concentró al vacío para dar 120 mg del producto del título en forma de la sal HCl (94 %). RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,67-1,72 (m, 2H), 2,02-2,06 (m, 2H), 3,13-3,16 (m, 2H), 3,34-3,38 (m, 1H), 3,42 (s, 3H), 3,98-4,02 (m, 2H), 7,82-7,90 (m, 3H). $[\text{M}+\text{H}]$ calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_6\text{O}$, 353; encontrado, 353. RMN ^1H (400 MHz, $\text{METANOL}-d_4$): δ ppm 1,73-1,91 (m, 2H), 2,18 (d, $J = 12,13$ Hz, 2H), 3,06 (t, $J = 12,76$ Hz, 2H), 3,33-3,40 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,83 (d, $J = 13,14$ Hz, 2H), 7,75-7,93 (m, 3H).

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) m/z	Datos del espectro de RMN
21	<p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	433	RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1,89-1,93 (m, 2H), 2,18-2,21 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,74 (s, 3H), 3,11-3,17 (m, 2H), 3,33-3,39 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,4-3,97 (m, 2H), 7,28 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 7,63-7,67 (m, 1H), 7,74 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,12 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 8,65 (s, 1H).

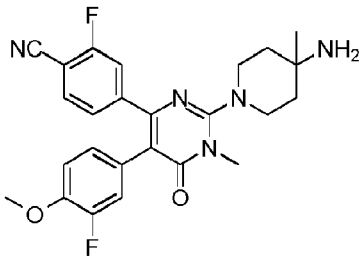
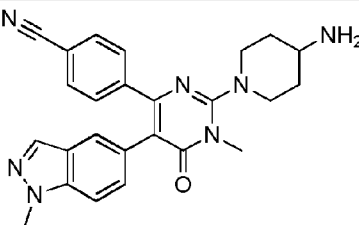
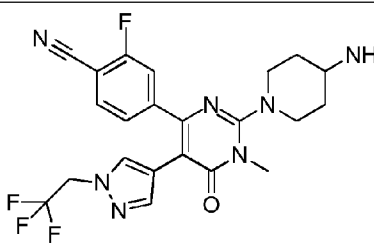
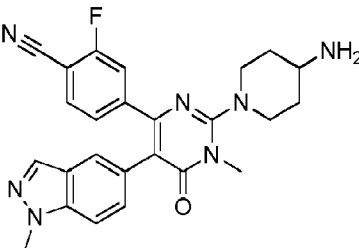
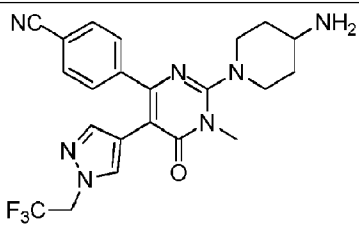
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
22	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	492	RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃): δ 1,74-1,80 (m, 4H), 1,93-1,97 (m, 2H), 3,11 (s, 2H), 3,26-3,35 (m, 6H), 3,47 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 6,68 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,4 Hz, 1H), 6,86-6,72 (m, 2H), 7,11 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,30 (dd <i>J</i> = 1,2, 10,8 Hz, 1H), 7,46 (dd <i>J</i> = 6,8, 7,6 Hz, 1H).
23	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	472	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,75-1,82 (m, 2H), 2,03-2,06 (m, 2H), 3,06-3,12 (m, 2H), 3,22-3,34 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,1 (d, <i>J</i> = 13,6 Hz, 2H), 7,07-7,09 (m, 1H), 7,36-7,38 (m, 1H), 7,51-7,55 (m, 1H), 7,66 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,79-7,82 (m, 1H), 8,33 (s, 1H).
24	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	439	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,96-2,01 (m, 2H), 2,20-2,22 (m, 2H), 3,23-3,32 (m, 2H), 3,46-3,49 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,94-3,97 (m, 2H), 4,39 (s, 3H), 7,55-7,77 (m, 7H), 8,76 (s, 1H).
25	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	452	RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1,72-1,93 (m, 3H), 1,97-2,23 (m, 1H), 3,16-3,30 (m, 2H), 3,50-3,55 (m, 2H), 3,60 (s, 3H), 3,83-3,84 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 6,82 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 6,97-7,05 (m, 2H), 7,25 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 7,44 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,62 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H).
26	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	453	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,64-1,69 (m, 2H), 1,89-1,92 (m, 2H), 2,85-2,91 (m, 2H), 3,15-3,20 (m, 1H), 3,34 (s, 3H), 3,62 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 3,71 (s, 3H), 6,99 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,20-7,40 (m, 4H).

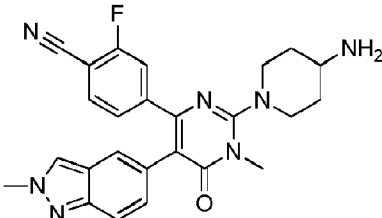
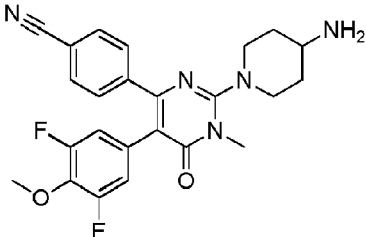
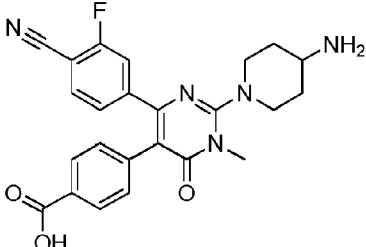
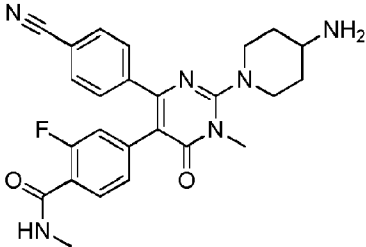
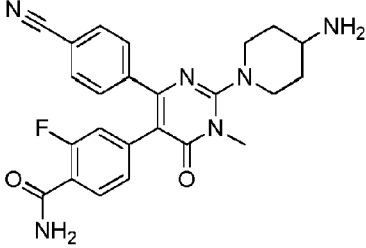
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
27	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	438	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,19-2,22 (m, 1H), 2,49-2,51 (m, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,75-3,81 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,87-3,93 (m, 1H), 4,02-4,06 (m, 2H), 6,80 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,00 (t, <i>J</i> = 10,8 Hz, 2H), 7,25 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H), 7,44 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,61 (t, <i>J</i> = 7,4 Hz,
28	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	452	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,69-1,99 (m, 3H), 2,14-2,19 (m, 1H), 3,09-3,24 (m, 2H), 3,43-3,46 (m, 1H), 3,56-3,60 (m, 4H), 3,77-3,80 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 6,77 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 6,94-7,00 (m, 2H), 7,21 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,39 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 8,56-7,60 (m, 1H).
29	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	438	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,25-2,29 (m, 1H), 2,50-2,55 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 3,89-3,84 (m, 5H), 3,99-4,03 (m, 1H), 5,05-4,16 (m, 2H), 6,80 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 6,97-7,03 (m, 2H), 7,29 (dd, <i>J</i> = 2,4, 8,0 Hz, 1H), 7,47 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 7,64 (dd, <i>J</i> = 6,8, 8,0 Hz, 1H).
30	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,73-2,02 (m, 3H), 2,19-2,23 (m, 1H), 3,13-3,26 (m, 2H), 3,49-3,52 (m, 2H), 3,60 (s, 3H), 3,77-3,85 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 6,89 (d, <i>J</i> = 11,6 Hz, 2H), 7,08-7,10 (d, <i>J</i> = 11,6 Hz, 2H), 7,24 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,41 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,57-7,61 (m, 1H).
31	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,69-1,99 (m, 3H), 2,07-2,10 (m, 1H), 3,09-3,24 (m, 2H), 3,43-3,46 (m, 1H), 3,56-3,60 (m, 4H), 3,68 (s, 3H), 3,76-3,79 (m, 1H), 6,75 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,96 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H), 7,13 (dd, <i>J</i> = 2,0, 8,0 Hz, 1H), 7,27 (dd, <i>J</i> = 0,8, 10,4 Hz, 1H), 7,47 (dd, <i>J</i> = 6,8, 8,0 Hz, 1H).

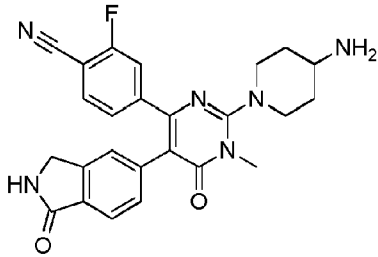
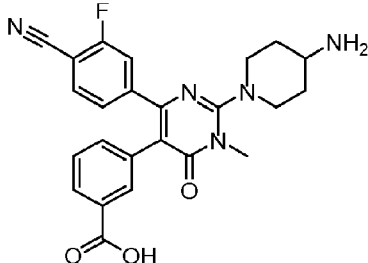
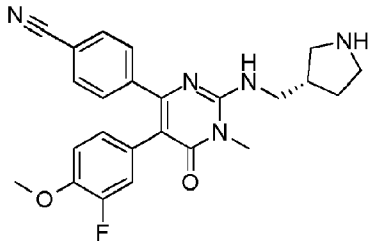
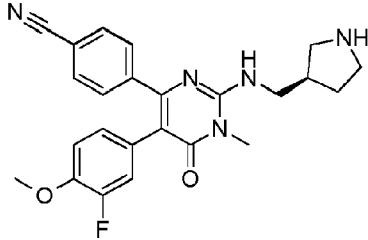
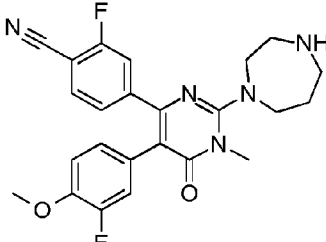
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
32	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	466	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,41 (s, 3H), 1,82-1,85 (m, 2H), 1,91-1,99 (m, 2H), 3,22-3,25 (m, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,50-3,57 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 6,69 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 6,86-6,92 (m, 2H), 7,14 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,32 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,47-7,51 (m, 1H).
33	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	439	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,95-1,99 (m, 2H), 2,19-2,22 (m, 2H), 3,20-3,26 (m, 2H), 3,45-3,50 (m, 1H), 3,63 (s, 3H), 3,90 (d, <i>J</i> = 12,8 Hz, 2H), 4,06 (s, 3H), 7,21 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,48-7,57 (m, 6H), 7,96 (s, 1H).
34	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	476	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,75-1,79 (m, 2H), 2,02-2,05 (m, 2H), 3,00-3,06 (m, 2H), 3,21-3,31 (m, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,72-3,75 (m, 2H), 4,77-4,81 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 7,31 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,39 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H), 7,60-7,64 (m, 2H).
35	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	457	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,85-1,99 (m, 2H), 2,18-2,20 (m, 2H), 3,19-3,24 (m, 2H), 3,46-3,50 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,86-3,92 (m, 2H), 4,10 (s, 3H), 7,21-7,25 (m, 2H), 7,40-7,53 (m, 4H), 8,01 (s, 1H).
36	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	458	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,79-1,82 (m, 2H), 2,04-2,07 (m, 2H), 3,09-3,15 (m, 2H), 3,32-3,38 (m, 1H), 3,50 (s, 3H), 3,76-3,79 (m, 2H), 4,74-4,78 (m, 2H), 7,12 (s, 1H), 7,55 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,62 (s, 1H), 7,67 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H).

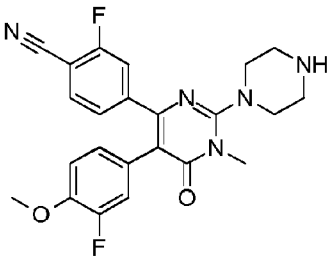
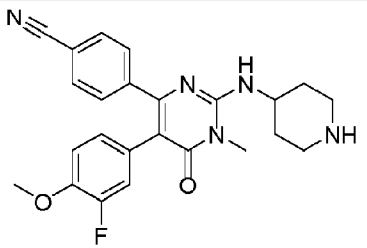
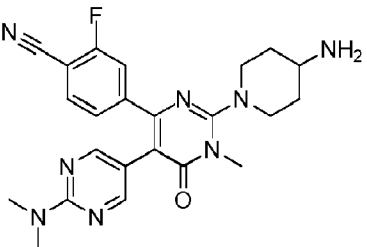
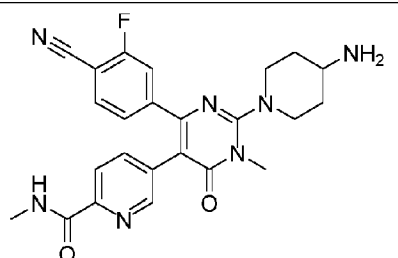
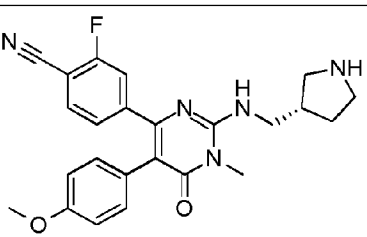
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
37	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	458	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,98-2,04 (m, 2H), 2,21-2,24 (m, 2H), 3,27-3,30 (m, 2H), 3,50-3,52 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,98 (d, <i>J</i> = 12,8 Hz, 2H), 4,42 (s, 3H), 7,33 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,49 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,60-7,73 (m, 3H), 7,84 (s, 1H), 8,85 (s, 1H).
38	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	452	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,87-1,94 (m, 2H), 2,15 (d, <i>J</i> = 12,0 Hz, 2H), 3,13 (t, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 3,39-3,43 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 3,87 (d, <i>J</i> = 12,8 Hz, 2H), 3,97 (s, 3H), 6,79 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,55 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,70 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H).
39	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,91-1,94 (m, 2H), 2,16-2,19 (m, 2H), 3,15-3,21 (m, 2H), 3,50-3,52 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,90 (d, <i>J</i> = 12,4 Hz, 2H), 7,22 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,30 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,43 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,59 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 7,86 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H).
40	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	461	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,88-1,91 (m, 2H), 2,12-2,13 (m, 2H), 2,94 (s, 3H), 3,13-3,15 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,89 (d, <i>J</i> = 14,4 Hz, 2H), 7,00 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,11 (d, <i>J</i> = 12,0 Hz, 1H), 7,53 (d, <i>J</i> = 12,0 Hz, 2H), 7,61-7,64 (m, 3H).
41	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	447	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,87-1,91 (m, 2H), 2,14-2,16 (m, 2H), 3,15 (t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 2H), 3,30-3,40 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,89 (d, <i>J</i> = 14,0 Hz, 2H), 7,01 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,13 (d, <i>J</i> = 12,0 Hz, 1H), 7,52-7,77 (m, 5H).

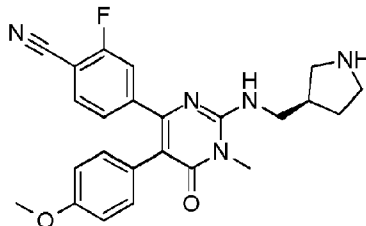
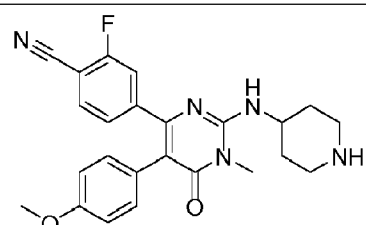
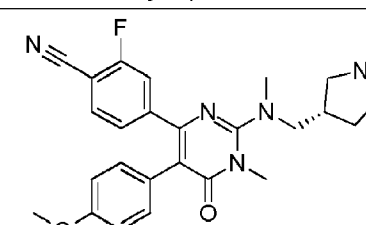
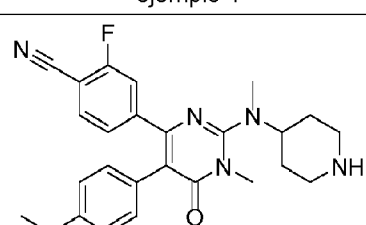
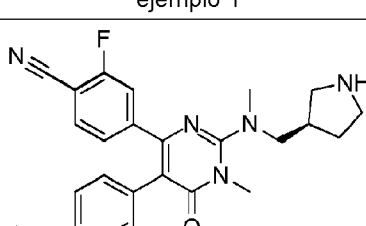
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) m/z	Datos del espectro de RMN
42	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	459	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 178-1,79 (m, 2H), 2,03-2,05 (m, 2H), 3,00-3,06 (m, 2H), 3,21-3,31 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,75-3,78 (m, 2H), 4,32 (s, 2H), 7,06 (dd, J = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,31-7,36 (m, 2H), 7,42 (dd, J = 6,4, 7,6 Hz, 1H), 7,58 (d, J = 7,6 Hz, 1H).
43	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,77-1,80 (m, 2H), 2,02-2,05 (m, 2H), 3,01-3,05 (m, 2H), 3,35-3,36 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,74-3,98 (m, 2H), 7,07 (dd, J = 1,6, 8,4 Hz, 1H), 7,27-7,32 (m, 3H), 7,44 (dd, J = 6,8, 8,0 Hz, 1H), 7,73 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,84 (d, J = 7,2 Hz, 1H).
44	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,87-1,91 (m, 1H), 2,25-2,28 (m, 1H), 2,87-2,92 (m, 1H), 3,11-3,17 (m, 1H), 3,30-3,32 (m, 1H), 3,41-3,56 (m, 5H), 3,69-3,71 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 6,75 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,92-6,96 (m, 2H), 7,53 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,66 (d, J = 8,4 Hz, 2H).
45	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,74-1,80 (m, 1H), 2,14-2,19 (m, 1H), 2,77-2,81 (m, 1H), 3,01-3,06 (m, 1H), 3,31-3,34 (m, 1H), 3,36-3,45 (m, 5H), 3,59-3,60 (m, 2H), 3,71 (s, 3H), 6,63 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,80-6,84 (m, 2H), 7,44 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H).
46	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	452	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,15-2,18 (m, 2H), 3,31-3,34 (m, 2H), 3,46-3,51 (m, 5H), 3,56-3,59 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,78-3,81 (m, 2H), 6,68 (dd, J = 1,2, 8,4 Hz, 1H), 6,85-6,89 (m, 2H), 7,12 (dd, J = 1,2, 7,6 Hz, 1H), 7,28 (dd, J = 1,6, 10,8 Hz, 1H), 7,47 (dd, J = 6,8, 8,0 Hz, 1H).

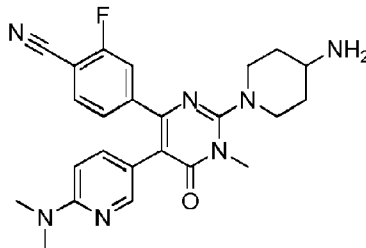
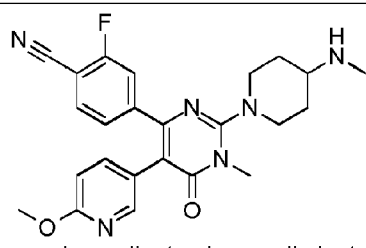
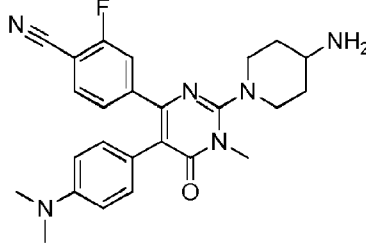
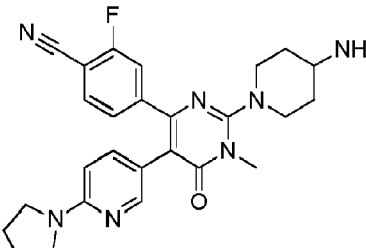
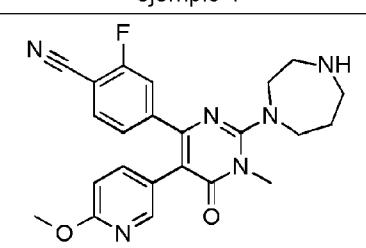
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
47	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	438	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 3,27-3,34 (m, 4H), 3,45 (s, 3H), 3,51-3,53 (m, 4H), 3,81 (s, 3H), 6,78 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,02-7,08 (m, 2H), 7,18 (dd, <i>J</i> = 1,6, 8,4 Hz, 1H), 7,45 (dd, <i>J</i> = 1,6, 10,8 Hz, 1H), 7,80 (dd, <i>J</i> = 7,2, 8,0 Hz, 1H), 9,41 (a, 1H).
48	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 184-1,94 (m, 2H), 2,20-2,23 (m, 2H), 3,00-3,07 (m, 2H), 3,38-3,42 (m, 5H), 3,72 (s, 3H), 4,22-4,27 (m, 1H), 6,61 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 6,79-6,83 (m, 2H), 7,39 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,51 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H).
49	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	449	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,82-1,87 (m, 2H), 2,04-2,07 (m, 2H), 3,06-3,12 (m, 2H), 3,25 (s, 6H), 3,28-3,39 (m, 1H), 3,49 (s, 3H), 3,81-3,84 (m, 2H), 7,37 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,56 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H), 7,42 (t, <i>J</i> = 6,8 Hz, 1H), 8,31 (s, 2H).
50	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	462	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,93-1,97 (m, 2H), 2,17-2,20 (m, 2H), 3,03 (s, 3H), 3,20-3,26 (m, 2H), 3,47-3,53 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,98-4,02 (m, 2H), 7,32 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,60 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,67 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 1H), 8,32 (s, 2H), 8,83 (s, 1H).
51	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,89-1,91 (m, 1H), 2,26-2,28 (m, 1H), 2,91-2,93 (m, 1H), 3,12-3,15 (m, 1H), 3,30-3,32 (m, 1H), 3,42-3,55 (m, 5H), 3,70-3,72 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 6,84 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,03 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,29 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,39 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,64 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H).

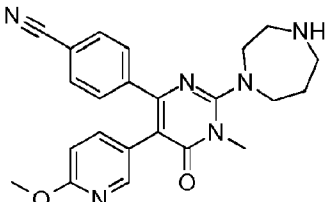
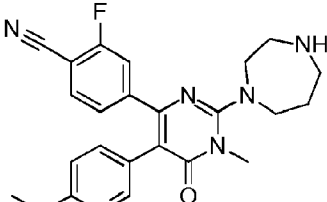
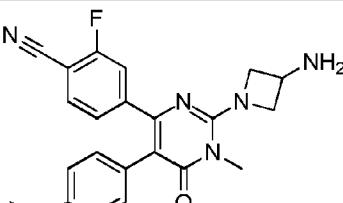
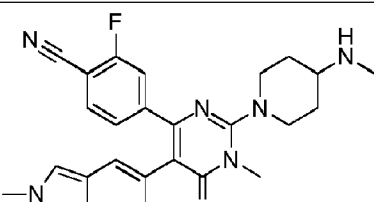
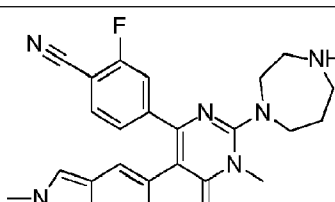
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
52	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,86-1,91 (m, 1H), 2,22-2,28 (m, 1H), 2,97-2,91 (m, 1H), 3,10-3,13 (m, 1H), 3,29-3,32 (m, 1H), 3,40-3,51 (m, 5H), 3,67-3,69 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 6,84 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,02 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,27 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,35 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 7,64 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H).
53	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,03-2,06 (m, 2H), 2,32-2,35 (m, 2H), 3,14-3,21 (m, 2H), 3,51-3,56 (m, 5H), 3,78 (s, 3H), 4,37-4,39 (m, 1H), 6,84 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H), 7,02 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,27 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,38 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 7,62 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H).
54	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,66-1,71 (m, 1H), 2,11-2,16 (m, 1H), 2,77-2,81 (m, 1H), 2,93-2,97 (m, 4H), 3,16-3,20 (m, 1H), 3,30-3,38 (m, 2H), 3,43-3,50 (m, 5H), 3,69 (s, 3H), 6,75 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 6,95 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,16 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,28 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,50 (dd, <i>J</i> = 6,8, 8,0 Hz, 1H).
55	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,03-2,13 (m, 4H), 2,84 (s, 3H), 3,01-3,05 (m, 2H), 3,39-3,43 (m, 2H), 3,48 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 3,87-3,92 (m, 1H), 6,74 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,95 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,13 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,21 (dd, <i>J</i> = 1,6, 10,4 Hz, 1H), 7,45 (dd, <i>J</i> = 6,8, 7,6 Hz, 1H).
56	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,77-1,80 (m, 1H), 2,22-2,26 (m, 1H), 2,90-2,92 (m, 1H), 3,03-3,07 (m, 4H), 3,27-3,30 (m, 1H), 3,39-3,41 (m, 2H), 3,44-3,46 (m, 5H), 3,77 (s, 3H), 6,86 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,06 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,29 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,36 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,58 (dd, <i>J</i> = 6,8, 7,6 Hz, 1H).

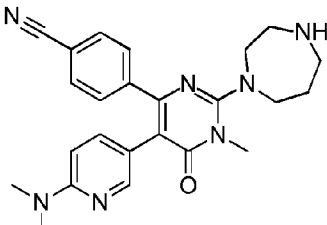
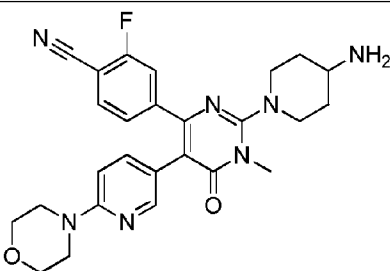
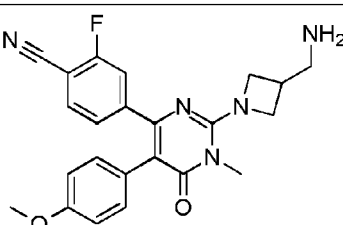
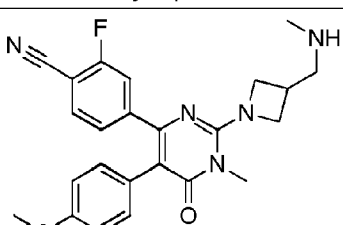
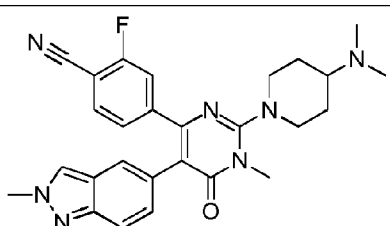
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
57	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,77-1,85 (m, 2H), 2,03-2,06 (m, 2H), 3,03-3,09 (m, 2H), 3,18 (s, 6H), 3,31-3,38 (m, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,78-3,81 (m, 2H), 7,03 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 1H), 7,28 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 1H), 7,46 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,59-7,63 (m, 2H), 7,71 (s, 1H).
58	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	449	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,83-1,88 (m, 2H), 2,21-2,24 (m, 2H), 2,77 (s, 3H), 3,06-3,14 (m, 2H), 3,31-3,32 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,87-3,91 (m, 5H), 6,83 (d, <i>J</i> = 11,2 Hz, 1H), 7,22 (dd, <i>J</i> = 2,0, 10,8 Hz, 1H), 7,42 (dd, <i>J</i> = 2,0, 14,4 Hz, 1H), 7,59-7,65 (m, 2H), 7,84 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H).
59	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	447	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,88-1,89 (m, 2H), 2,14-2,19 (m, 2H), 3,13-3,19 (m, 2H), 3,28 (s, 6H), 3,41-3,46 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,87-3,91 (m, 2H), 7,24 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,39-7,44 (m, 3H), 7,59-7,67 (m, 3H).
60	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	474	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,91-1,97 (m, 2H), 2,16-2,20 (m, 6H), 3,14-3,20 (m, 2H), 3,47-3,49 (m, 1H), 3,60-3,63 (m, 7H), 3,89-3,92 (m, 2H), 7,31 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H), 7,01 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H), 7,41 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,58 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,68-7,75 (m, 2H), 7,79 (s, 1H).
61	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	435	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,27-2,30 (m, 2H), 3,44-3,47 (m, 2H), 3,60-3,64 (m, 5H), 3,70-3,73 (m, 2H), 3,91-3,94 (m, 5H), 6,83 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,24 (dd, <i>J</i> = 1,6, 8,0 Hz, 1H), 7,43 (dd, <i>J</i> = 1,2, 10,4 Hz, 1H), 7,59-7,66 (m, 2H), 7,84 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H).

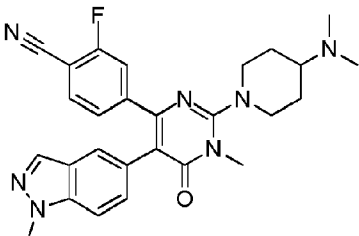
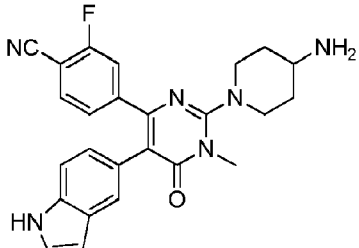
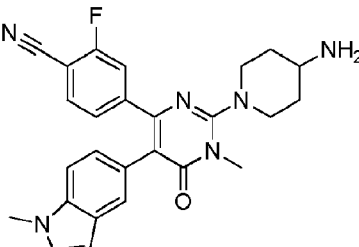
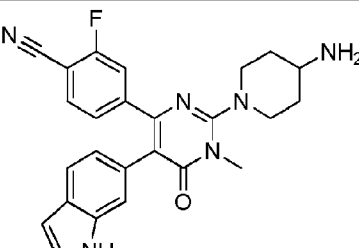
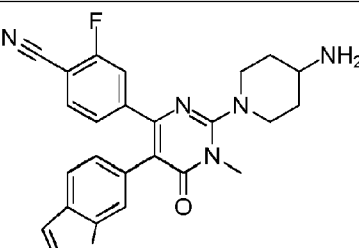
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
62	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	417	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,27-2,31 (m, 2H), 3,44-3,47 (m, 2H), 3,60-3,64 (m, 5H), 3,70-3,73 (m, 2H), 3,91-3,94 (m, 5H), 6,81 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,53 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,58 (dd, <i>J</i> = 2,4, 8,8 Hz, 1H), 7,64 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,84 (d, <i>J</i> = 1,2 Hz, 1H).
63	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,31-2,33 (m, 2H), 3,27 (s, 6H) 3,44-3,47 (m, 2H), 3,60-3,67 (m, 5H), 3,73-3,76 (m, 2H), 3,96-3,99 (m, 2H), 6,81 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,53 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,58 (dd, <i>J</i> = 2,4, 8,8 Hz, 1H), 7,64 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,84 (d, <i>J</i> = 1,2 Hz, 1H).
64	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	406	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 3,39 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 4,09-4,10 (m, 1H), 4,17-4,21 (m, 2H), 4,55-4,59 (m, 2H), 6,74 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,96 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,10 (dd, <i>J</i> = 1,6, 8,4 Hz, 1H), 7,23 (dd, <i>J</i> = 1,6, 10,8 Hz, 1H), 7,45 (dd, <i>J</i> = 6,8, 8,0 Hz, 1H).
65	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	472	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,85-1,98 (m, 2H), 2,23-2,27 (m, 2H), 2,78 (s, 3H), 3,38-3,40 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,90-3,95 (m, 2H), 4,41 (s, 3H), 7,26 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,40 (d, <i>J</i> = 13,6 Hz, 1H), 7,49-7,57 (m, 2H), 7,65 (dd, <i>J</i> = 6,8, 11,6 Hz, 1H), 7,73 (s, 1H), 8,66 (s, 1H).
66	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	458	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,19-2,20 (m, 2H), 3,33-3,36 (m, 2H), 3,50-3,53 (m, 5H), 3,60-3,63 (m, 2H), 3,83-3,85 (m, 2H), 4,42 (s, 3H), 7,13 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 1H), 7,28 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 7,34 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 1H), 7,40 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 7,52 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 7,58 (s, 1H), 8,48 (s, 1H).

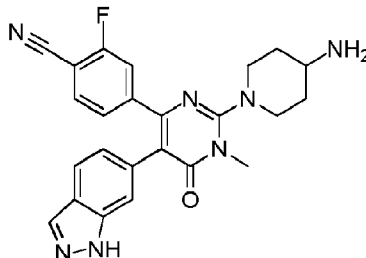
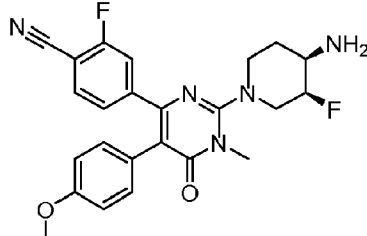
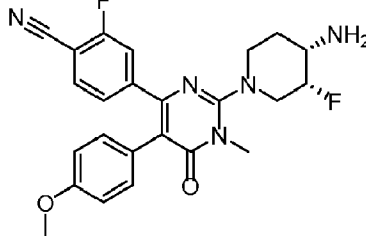
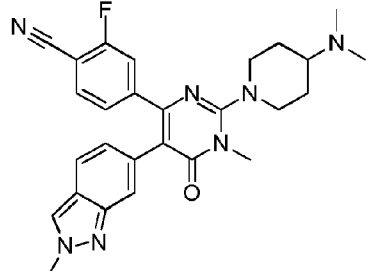
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
67	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	430	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,33-2,35 (m, 2H), 3,27 (s, 6H), 3,46-3,49 (m, 2H), 3,62-3,66 (m, 5H), 3,75-3,78 (m, 2H), 3,98-4,02 (m, 2H), 6,73 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 1H), 7,67-7,72 (m, 5H), 7,80 (s, 1H).
68	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	490	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,89-1,97 (m, 2H), 2,15-2,18 (m, 2H), 3,15-3,21 (m, 2H), 3,43-3,49 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,69-3,71 (m, 4H), 3,86-3,94 (m, 6H), 7,31 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H), 7,41 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,59 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,72-7,80 (m, 2H), 7,91 (s, 1H).
69	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	420	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,99-3,06 (m, 1H), 3,30-3,32 (m, 2H), 3,49 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 4,10-4,15 (m, 2H), 4,46-4,52 (m, 2H), 6,83 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,01 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,19 (dd, <i>J</i> = 2,0, 10,8 Hz, 1H), 7,33 (dd, <i>J</i> = 2,0, 14,4 Hz, 1H), 7,45 (dd, <i>J</i> = 8,8, 10,8 Hz, 1H).
70	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,78 (s, 3H), 3,07-3,10 (m, 1H), 3,37-3,39 (m, 2H), 3,48 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 4,12-4,15 (m, 2H), 4,47-4,52 (m, 2H), 6,84 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,01 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,20 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,33 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 7,45 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H).
71	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	486	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,67-1,73 (m, 2H), 2,02-2,06 (m, 2H), 2,33 (s, 6H), 2,41-2,45 (m, 1H), 2,95-3,03 (m, 2H), 3,59 (s, 3H), 3,79-3,84 (m, 2H), 4,18 (s, 3H), 7,10 (dd, <i>J</i> = 2,0, 12,0 Hz, 1H), 7,23 (dd, <i>J</i> = 1,6, 10,8 Hz, 1H), 7,37 (dd, <i>J</i> = 2,0, 14,4 Hz, 1H), 7,46-7,56 (m, 3H), 8,11 (s, 1H).

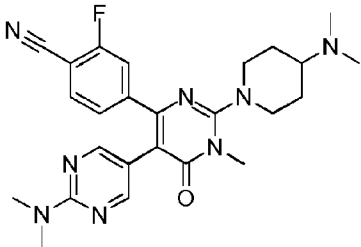
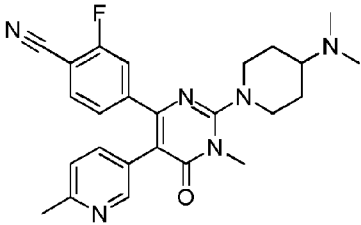
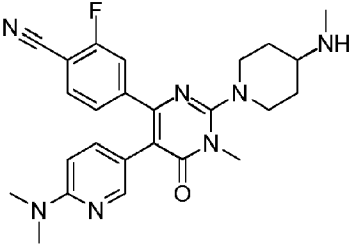
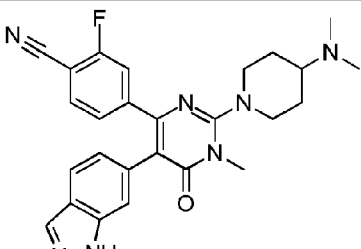
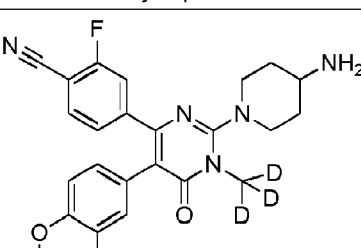
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
72	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	486	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 1,50-1,63 (m, 2H), 1,85-1,89 (m, 2H), 2,18 (s, 6H), 2,21-2,27 (m, 1H), 2,85-2,92 (m, 2H), 3,45 (s, 3H), 3,67-3,71 (m, 2H), 4,00 (s, 3H), 7,09-7,17 (m, 2H), 7,39 (dd, <i>J</i> = 1,6, 14,4 Hz, 1H), 7,51-7,54 (m, 2H), 7,69 (t, <i>J</i> = 9,2 Hz, 1H), 7,97 (s, 1H).
73	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 18</p>	443	RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1,85-1,91 (m, 2H), 2,11-2,16 (m, 2H), 3,06-3,14 (m, 2H), 3,36-3,40 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,81-3,85 (m, 2H), 6,85 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 7,22 (d, <i>J</i> = 3,0 Hz, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,33-7,48 (m, 4H).
74	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 18</p>	456	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,53-1,56 (m, 2H), 1,88-1,91 (m, 2H), 2,87-2,95 (m, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,62 (d, <i>J</i> = 13,6 Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 6,26 (s, 1H), 6,81 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1H), 7,04-7,35 (m, 6H).
75	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 18</p>	442	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,88-1,94 (m, 2H), 2,13-2,16 (m, 2H), 3,05-3,16 (m, 2H), 3,33-3,42 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,84-3,86 (m, 2H), 6,74-6,77 (m, 1H), 7,20-7,50 (m, 7H).
76	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	457	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,51-1,54 (m, 2H), 1,88-1,91 (m, 2H), 2,84-2,97 (m, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,62-3,65 (m, 5H), 6,31 (d, <i>J</i> = 2,8 Hz, 1H), 6,61 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,06 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H), 7,13-7,18 (m, 3H), 7,27 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 1H), 7,33-7,37 (m, 2H).

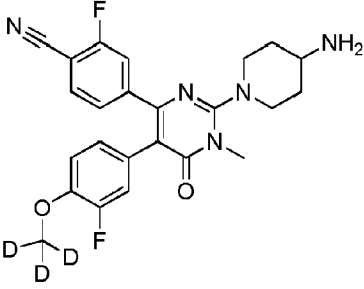
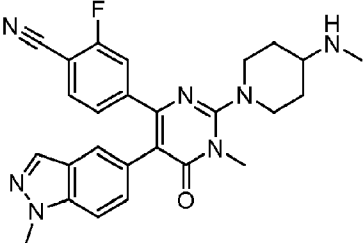
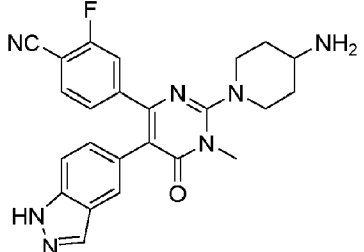
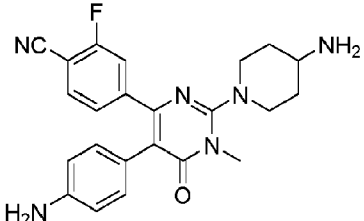
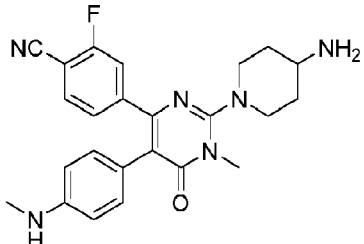
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
77	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	444	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,65-1,68 (m, 2H), 2,01-2,04 (m, 2H), 2,98-3,12 (m, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,78-3,82 (m, 2H), 6,94 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,24 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,43-7,45 (m, 2H), 7,50 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 7,72 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 8,06 (s, 1H).
78	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	452	RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1,84-1,91 (m, 1H), 2,01-2,06 (m, 1H), 3,00-3,08 (m, 2H), 3,16-3,21 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,75-3,82 (m, 4H), 3,93-4,01 (m, 1H), 4,70-4,82 (m, 1H), 6,86 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2H), 7,06 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,24 (dd, <i>J</i> = 0,9, 8,1 Hz, 1H), 7,34 (dd, <i>J</i> = 1,5, 10,8 Hz, 1H), 7,54-7,58 (m, 1H).
79	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	452	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,87-1,91 (m, 1H), 2,03-2,07 (m, 1H), 3,02-3,08 (m, 2H), 3,19-3,29 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 3,77-3,83 (m, 4H), 3,95-4,01 (m, 1H), 4,73-4,85 (m, 1H), 6,87 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,07 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,26 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,4 Hz, 1H), 7,36 (dd, <i>J</i> = 1,2, 10,8 Hz, 1H), 7,56 (t, <i>J</i> = 6,8 Hz, 1H).
80	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	486	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,71-1,77 (m, 2H), 2,05-2,08 (m, 2H), 2,38 (s, 6H), 2,45-2,48 (m, 1H), 2,98-3,05 (m, 2H), 3,61 (s, 3H), 3,83-3,86 (m, 2H), 4,20 (s, 3H), 6,93 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,8 Hz, 1H), 7,27 (dd, <i>J</i> = 1,2, 7,6 Hz, 1H), 7,36-7,41 (m, 2H), 7,49-7,53 (m, 1H), 7,66 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 8,18 (s, 1H).

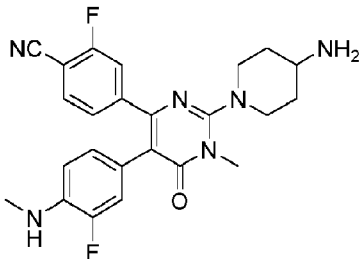
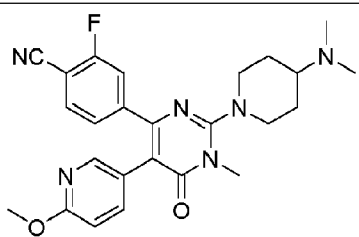
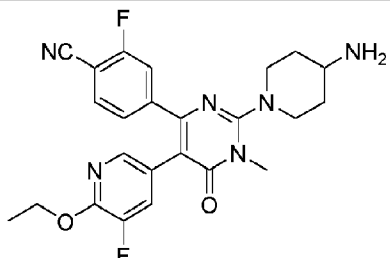
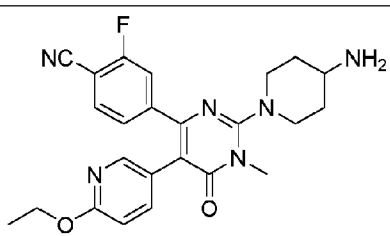
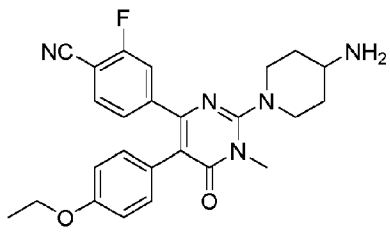
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
81	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	477	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2,03-2,06 (m, 2H), 2,25-2,27 (m, 2H), 2,98 (s, 6H), 3,14-3,20 (m, 2H), 3,36 (s, 6H), 3,56-3,60 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 4,01-4,04 (m, 2H), 7,49 (d, <i>J</i> = 4,4 Hz, 1H), 7,67 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,75-7,78 (m, 1H), 8,43 (s, 2H).
82	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	447	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,56-1,62 (m, 2H), 1,91-1,94 (m, 2H), 2,25 (s, 6H), 2,31-2,37 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,87-2,93 (m, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,72-3,76 (m, 2H), 7,10 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,15 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,28-7,31 (m, 1H), 7,49-7,52 (m, 2H), 7,80 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H).
83	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	462	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,92-2,04 (m, 2H), 2,24-2,26 (m, 2H), 2,79 (s, 3H), 3,14-3,20 (m, 2H), 3,30 (s, 6H), 3,37-3,40 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,94-3,98 (m, 2H), 7,16 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 1H), 7,42 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,61 (d, <i>J</i> = 10,0 Hz, 1H), 7,71-7,76 (m, 2H), 7,84 (d, <i>J</i> = 1,2 Hz, 1H).
84	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	472	RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃): δ 1,61-1,69 (m, 2H), 1,98-2,01 (m, 2H), 2,32 (s, 6H), 2,32-2,33 (m, 1H), 2,88-2,94 (m, 2H), 3,53 (s, 3H), 3,65-3,69 (m, 2H), 6,73 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,8 Hz, 1H), 7,00 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,19-7,30 (m, 2H), 7,37 (s, 1H), 7,52 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,90 (s, 1H), 10,65 (a, 1H).
85	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	455	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,88-1,92 (m, 2H), 2,15-2,18 (m, 2H), 3,12-3,18 (m, 2H), 3,40-3,46 (m, 1H), 3,85-3,88 (m, 5H), 6,81 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 6,98-7,05 (m, 2H), 7,25 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,4 Hz, 1H), 7,42 (d, <i>J</i> = 11,2 Hz, 1H), 7,61 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H).

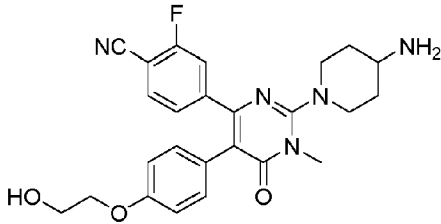
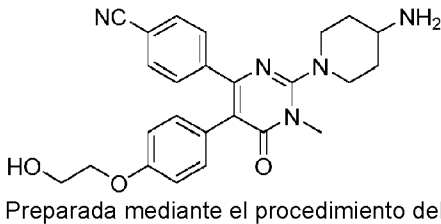
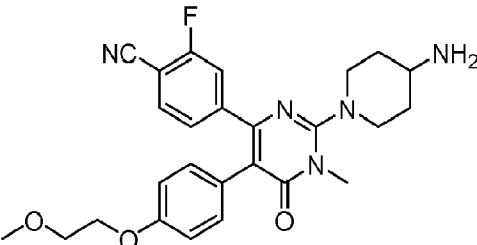
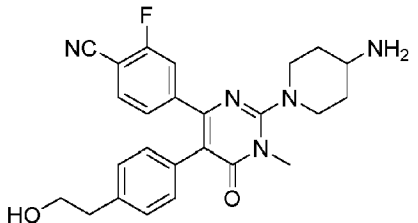
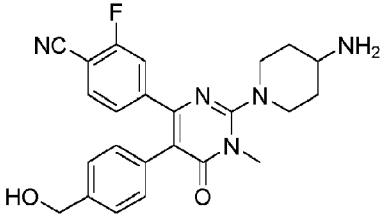
(continuación)

Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
86	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	455	<p>RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,88-1,92 (m, 2H), 2,14-2,17 (m, 2H), 3,11-3,17 (m, 2H), 3,42-3,47 (m, 1H), 3,59 (s, 3H), 3,85-3,88 (m, 2H), 6,81 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 6,98-7,05 (m, 2H), 7,25 (dd, <i>J</i> = 1,2, 8,0 Hz, 1H), 7,42 (d, <i>J</i> = 10,4 Hz, 1H), 7,60 (dd, <i>J</i> = 0,8, 7,6 Hz, 1H).</p>
87	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	472	<p>RMN ¹H (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆): δ ppm 1,79 (s a, 2H) 2,11 (s a, 2H) 2,97 (s a, 2H) 3,10-3,31 (m, 1H) 3,46 (s a, 3H) 3,74 (d, <i>J</i> = 18,19 Hz, 2H) 4,03 (s a, 3H) 7,12 (d, <i>J</i> = 13,39 Hz, 1H) 7,40-7,61 (m, 4H) 7,71 (s a, 1H) 7,87-8,07 (m, 1H) 9,15 (s a, 2H).</p>
88	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	444	<p>RMN ¹H (400 MHz, metanol-<i>d</i>₄): δ ppm 1,84 (d, <i>J</i> = 13,39 Hz, 2H) 2,11 (d, <i>J</i> = 13,14 Hz, 2H) 3,05-3,17 (m, 2H) 3,35-3,40 (m, 1H) 3,59 (s, 3H) 3,83 (d, <i>J</i> = 14,40 Hz, 2H) 7,17 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 2H) 7,41 (d, <i>J</i> = 10,61 Hz, 1H) 7,44-7,52 (m, 2H) 7,57 (s, 1H) 7,98 (s, 1H) 8,54 (s a, 1H).</p>
89	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	419	<p>RMN ¹H (400 MHz, metanol-<i>d</i>₄): δ ppm 1,74-1,96 (m, 2H) 2,11 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 3,08 (c, <i>J</i> = 11,54 Hz, 2H) 3,38 (s a, 1H) 3,57 (s a, 3H) 3,71-3,93 (m, 2H) 6,64 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 2H) 6,86 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 2H) 7,07-7,17 (m, 1H) 7,18-7,30 (m, 1H) 7,31-7,43 (m, 1H).</p>
90	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	433	<p>RMN ¹H (400 MHz, metanol-<i>d</i>₄): δ ppm 1,72-1,93 (m, 2H) 2,09 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 2,75 (s, 3H) 2,99-3,14 (m, 2H) 3,36-3,43 (m, 1H) 3,56 (s, 3H) 3,78 (d, <i>J</i> = 12,38 Hz, 2H) 6,54 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 2H) 6,89 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 2H) 7,27 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 1H) 7,32-7,43 (m, 1H) 7,48-7,62 (m, 1H).</p>

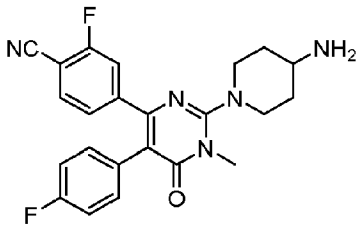
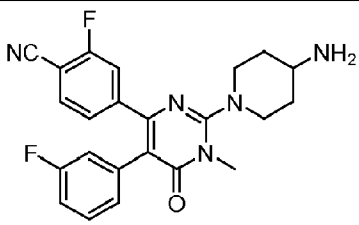
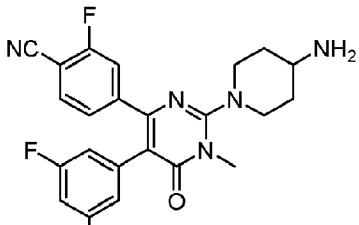
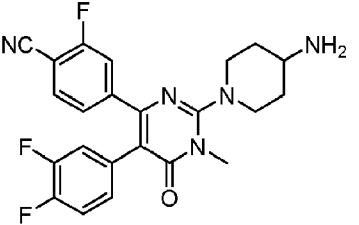
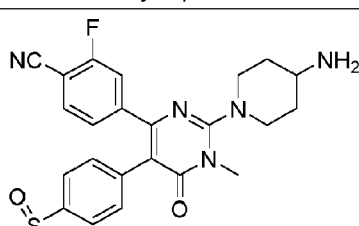
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) m/z	Datos del espectro de RMN
91	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	451	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,86 (d, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 2,12 (d, <i>J</i> = 11,12 Hz, 2H) 2,96 (s, 3H) 3,11 (t, <i>J</i> = 12,25 Hz, 2H) 3,40 (s a, 1H) 3,57 (s, 3H) 3,84 (d, <i>J</i> = 12,38 Hz, 2H) 6,90 (d, <i>J</i> = 8,59 Hz, 1H) 7,05 (t, <i>J</i> = 8,46 Hz, 1H) 7,12 (d, <i>J</i> = 12,38 Hz, 1H) 7,26 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 1H) 7,40 (d, <i>J</i> = 10,61 Hz, 1H) 7,60 (t, <i>J</i> = 7,20 Hz, 1H).
92	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	463	RMN ¹ H (400 MHz, cloroformo- <i>d</i>): δ ppm 1,71 (m, <i>J</i> = 11,37 Hz, 2H) 1,74 (s a, 1H) 2,04 (d, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 2,38 (s a, 6H) 2,96 (t, <i>J</i> = 12,76 Hz, 2H) 3,55 (s, 3H) 3,71 (d, <i>J</i> = 12,88 Hz, 2H) 3,91 (s, 3H) 6,73 (d, <i>J</i> = 8,59 Hz, 1H) 7,12 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 1H) 7,34 (d, <i>J</i> = 10,11 Hz, 1H) 7,43 (t, <i>J</i> = 7,07 Hz, 1H) 7,53 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 1H) 7,81 (s a, 1H).
93	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	467	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1,32 (td, <i>J</i> = 7,01, 1,39 Hz, 3H) 1,58 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 1,92 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 2,80 (s, 3H) 2,91-3,03 (m, 2H) 3,08 (s a, 1H) 3,69 (d, <i>J</i> = 10,36 Hz, 2H) 4,29-4,40 (m, 2H) 6,86 (s, 1H) 6,89 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 1H) 7,21 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 1H) 7,56 (d, <i>J</i> = 1,77 Hz, 1H) 7,81-7,86 (m, 1H) 8,33 (s, 3H).
94	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	449	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1,28 (td, <i>J</i> = 7,01, 2,40 Hz, 3H) 1,58 (s a, 2H) 1,89 (s a, 2H) 2,92-3,02 (m, 2H) 3,07 (s a, 1H) 3,43 (s, 3H) 3,68 (d, <i>J</i> = 13,39 Hz, 2H) 4,21-4,29 (m, 2H) 6,73 (d, <i>J</i> = 3,79 Hz, 1H) 6,80 (s, 1H) 6,93 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 1H) 7,20 (d, <i>J</i> = 8,59 Hz, 1H) 7,54 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 1H) 7,80-7,85 (m, 1H) 8,31 (s, 3H).
95	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1,31 (t, <i>J</i> = 6,69 Hz, 3H) 1,73 (d, <i>J</i> = 9,09 Hz, 2H) 2,00 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 2,99 (t, <i>J</i> = 12,51 Hz, 2H) 3,28 (s a, 1H) 3,43 (s, 3H) 3,71 (d, <i>J</i> = 12,38 Hz, 2H) 3,95-4,06 (m, 2H) 6,83 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 2H) 7,01 (d, <i>J</i> = 8,59 Hz, 2H) 7,18 (d, <i>J</i> = 8,59 Hz, 1H) 7,41 (d, <i>J</i> = 10,86 Hz, 1H) 7,61 (m, 1H) 7,79 (t, <i>J</i> = 7,83 Hz, 1H) 8,07 (s a, 3H).

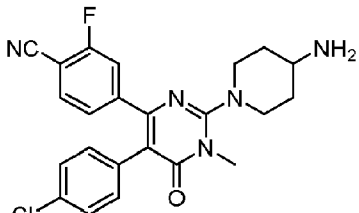
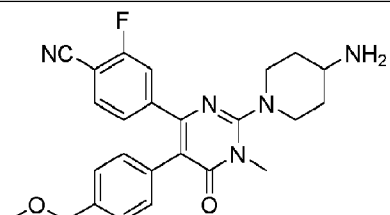
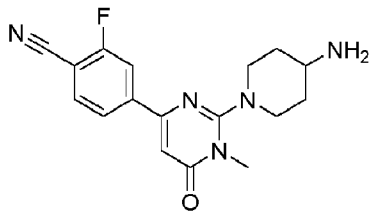
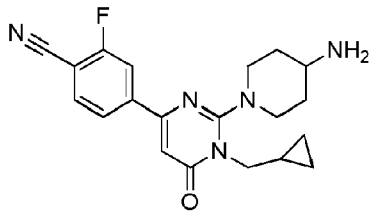
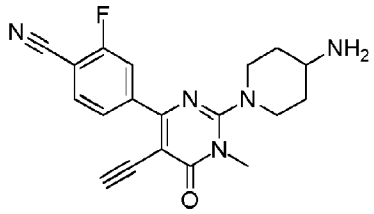
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) m/z	Datos del espectro de RMN
96	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	464	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,74 (d, <i>J</i> = 10,36 Hz, 2H) 2,00 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 2,99 (t, <i>J</i> = 12,25 Hz, 2H) 3,43 (s, 3H) 3,64 (s a, 2H) 3,71 (d, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 4,07 (s a, 2H) 6,85 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 2H) 7,01 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 2H) 7,18 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 1H) 7,41 (d, <i>J</i> = 10,36 Hz, 1H) 7,58-7,67 (m, 1H) 7,79 (t, <i>J</i> = 7,45 Hz, 1H) 8,14 (s a, 3H).
97	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	446	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄) δ ppm 1,87 (d, <i>J</i> = 11,12 Hz, 2H) 2,13 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 3,04-3,21 (m, 2H) 3,38 (d, <i>J</i> = 10,61 Hz, 1H) 3,57 (s, 3H) 3,77-3,88 (m, 4H) 4,02 (s a, 2H) 6,86 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 2H) 7,04 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 2H) 7,47-7,53 (m, 2H) 7,57 (d, <i>J</i> = 7,58 Hz, 2H).
98	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	478	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 1,74 (d, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 2,00 (d, <i>J</i> = 12,38 Hz, 2H) 2,99 (t, <i>J</i> = 12,25 Hz, 2H) 3,28 (s a, 1H) 3,43 (s, 3H) 3,44-3,54 (m, 2H) 3,70 (m, 5H) 3,90-4,05 (m, 2H) 6,85 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 2H) 7,01 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 2H) 7,18 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 1H) 7,42 (d, <i>J</i> = 10,61 Hz, 1H) 7,79 (t, <i>J</i> = 7,20 Hz, 1H) 8,11 (s a, 3H).
99	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,73 (d, <i>J</i> = 11,37 Hz, 2H) 2,00 (d, <i>J</i> = 12,63 Hz, 2H) 2,64-2,76 (m, 2H) 3,00 (t, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 3,29 (s a, 1H) 3,43 (s a, 3H) 3,48 (d, <i>J</i> = 9,85 Hz, 2H) 3,69-3,77 (m, 2H) 7,00 (d, <i>J</i> = 7,33 Hz, 2H) 7,13 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 2H) 7,18 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 1H) 7,34-7,42 (m, 1H) 7,75-7,80 (m, 1H) 8,06 (s a, 3H).
100	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1,73 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 1,94-2,03 (m, 2H) 3,00 (s a, 2H) 3,29 (s a, 1H) 3,44 (s, 3H) 3,48 (d, <i>J</i> = 9,60 Hz, 2H) 3,70 (s a, 2H) 7,06 (d, <i>J</i> = 7,33 Hz, 2H) 7,16-7,25 (m, 3H) 7,41 (d, <i>J</i> = 10,86 Hz, 1H) 7,75-7,82 (m, 1H) 8,05 (s a, 3H).

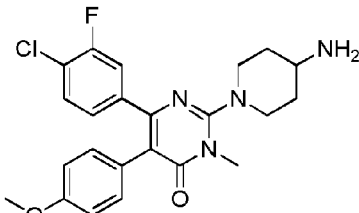
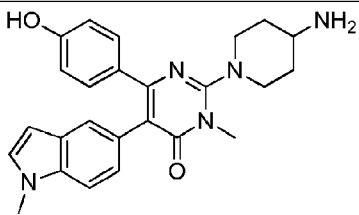
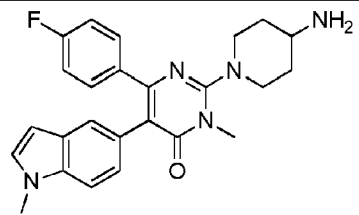
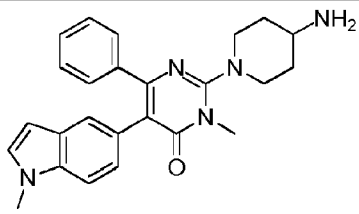
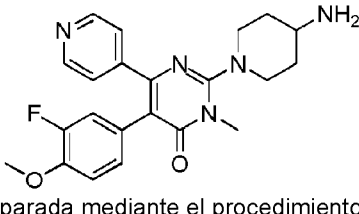
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
101	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	422	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,78-1,94 (m, 2H) 2,13 (d, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 3,10 (t, <i>J</i> = 12,51 Hz, 2H) 3,39 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 1H) 3,57 (s, 3H) 3,73-3,93 (m, 2H) 6,99-7,09 (m, 2H) 7,12-7,25 (m, 3H) 7,37 (d, <i>J</i> = 10,36 Hz, 1H) 7,57 (t, <i>J</i> = 6,95 Hz, 1H).
102	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	422	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,79-1,93 (m, 2H) 2,13 (d, <i>J</i> = 12,38 Hz, 2H) 3,11 (t, <i>J</i> = 12,63 Hz, 2H) 3,39 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 1H) 3,57 (s, 3H) 3,85 (d, <i>J</i> = 13,64 Hz, 2H) 6,89 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 1H) 6,96-7,07 (m, 2H) 7,23 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 1H) 7,25-7,33 (m, 1H) 7,38 (d, <i>J</i> = 10,36 Hz, 1H) 7,58 (t, <i>J</i> = 7,20 Hz, 1H).
103	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	440	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,77-1,95 (m, 2H) 2,13 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 3,12 (t, <i>J</i> = 12,76 Hz, 2H) 3,36-3,45 (m, 1H) 3,55 (s, 3H) 3,86 (d, <i>J</i> = 13,64 Hz, 2H) 6,78 (d, <i>J</i> = 6,57 Hz, 2H) 6,89 (t, <i>J</i> = 9,22 Hz, 1H) 7,24 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 1H) 7,43 (d, <i>J</i> = 10,11 Hz, 1H) 7,62 (t, <i>J</i> = 7,07 Hz, 1H).
104	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	440	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,79-1,93 (m, 2H) 2,12 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 3,11 (t, <i>J</i> = 12,63 Hz, 2H) 3,33-3,49 (m, 1H) 3,57 (s, 3H) 3,85 (d, <i>J</i> = 13,64 Hz, 2H) 6,87 (s a, 1H) 7,11-7,25 (m, 3H) 7,42 (d, <i>J</i> = 10,36 Hz, 1H) 7,60 (t, <i>J</i> = 7,20 Hz, 1H).
105	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	482	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,79-1,92 (m, 2H) 2,12 (d, <i>J</i> = 11,62 Hz, 2H) 3,05-3,29 (m, 5H) 3,40 (s a, 1H) 3,58 (s, 3H) 3,80-3,94 (m, 2H) 7,16 (d, <i>J</i> = 7,58 Hz, 1H) 7,36-7,48 (m, 3H) 7,58 (t, <i>J</i> = 7,20 Hz, 1H) 7,87 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 2H).

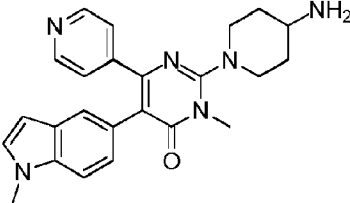
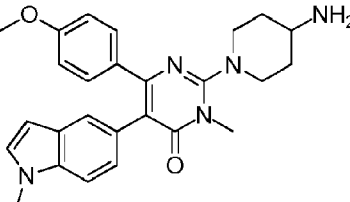
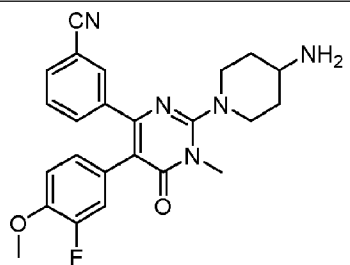
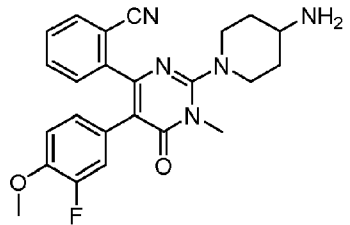
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
106	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	438	RMN ¹ H (400 MHz, cloroformo- <i>d</i>): δ ppm 1,89 (d, <i>J</i> = 11,12 Hz, 2H) 2,16 (d, <i>J</i> = 10,86 Hz, 2H) 3,05 (t, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 3,28 (s a, 1H) 3,55 (s, 3H) 3,71 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 7,04 (d, <i>J</i> = 8,34 Hz, 1H) 7,10 (d, <i>J</i> = 8,08 Hz, 2H) 7,27-7,30 (m, 1H) 7,33-7,44 (m, 2H) 8,31 (s a, 1H).
107	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	448	RMN ¹ H (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄): δ ppm 1,81-1,94 (m, 2H) 2,13 (d, <i>J</i> = 12,13 Hz, 2H) 3,12 (t, <i>J</i> = 12,38 Hz, 2H) 3,36 (s, 3H) 3,41 (s a, 1H) 3,58 (s, 3H) 3,84 (d, <i>J</i> = 12,63 Hz, 2H) 4,45 (s, 2H) 7,14 (d, <i>J</i> = 7,58 Hz, 2H) 7,23 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 1H) 7,28 (d, <i>J</i> = 7,83 Hz, 2H) 7,34 (d, <i>J</i> = 10,61 Hz, 1H) 7,55 (t, <i>J</i> = 7,20 Hz, 1H).
108	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 13</p>	328	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1,62-1,78 (m, 2H) 2,00 (d, <i>J</i> = 11,87 Hz, 2H) 3,02 (t, <i>J</i> = 12,00 Hz, 2H) 3,32 (s, 3H) 3,76 (d, <i>J</i> = 12,88 Hz, 2H) 6,87 (s, 1H) 7,95 (s a, 3H) 8,01-8,08 (m, 1H) 8,08-8,12 (m, 1H) 8,16 (d, <i>J</i> = 11,12 Hz, 1H).
109	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 13</p>	368	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 0,37-0,39 (m, 2H), 0,60-0,65 (m, 2H), 1,29-1,32 (m, 1H), 1,59-1,64 (m, 2H), 2,10-2,14 (m, 2H), 3,07-3,14 (m, 2H), 3,43-3,47 (m, 1H), 6,81 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H), 4,92-4,95 (m, 2H), 6,66 (s, 1H), 7,84-7,88 (m, 1H), 7,99-8,05 (m, 2H).
110	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 14</p>	352	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,40-1,41 (m, 2H), 1,81-1,84 (m, 2H), 2,75-2,78 (m, 1H), 2,89-2,95 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,65-3,68 (m, 2H), 3,77 (s, 1H), 7,66 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,89 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,96 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H).

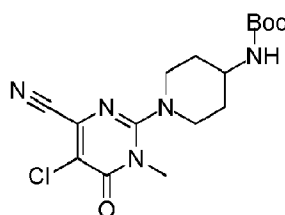
(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
111	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	442	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): 1,75-1,83 (m, 2H), 2,06 (d, <i>J</i> = 10,8 Hz, 2H), 2,99 (t, <i>J</i> = 11,6 Hz, 2H), 3,28-3,30 (m, 1H), 3,42 (s, 3H), 3,68-3,74 (m, 5H), 6,85 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H), 7,02-7,08 (m, 3H), 7,28-7,45 (m, 2H), 8,38-8,44 (m, 2H).
112	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	429	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,09-1,17 (m, 2H), 1,57-1,62 (m, 2H), 2,46-2,56 (m, 3H), 2,96-3,03 (m, 2H), 3,35 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 6,02 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,79-6,97 (m, 3H), 7,13-7,27 (m, 2H), 7,42-7,52 (m, 2H).
113	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	431	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): 1,06-1,17 (m, 2H), 1,57-1,62 (m, 2H), 2,49-2,56 (m, 3H), 2,96-3,09 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 6,07 (s, 1H), 6,40 (s, 1H), 6,97-7,20 (m, 4H), 7,27 (d, <i>J</i> = 11,8 Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,61-7,66 (m, 1H).
114	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	414	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 152-1,55 (m, 2H), 1,87-1,90 (m, 2H), 2,83-3,95 (m, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,59-3,67 (m, 5H), 6,23 (s, 1H), 6,81 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 6,98-7,08 (m, 4H), 8,14 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,24 (m, 3H).
115	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	410	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,90-2,05 (m, 2H), 2,16-2,19 (m, 2H), 3,12-3,20 (m, 2H), 3,44-3,49 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,90-3,92 (m, 2H), 6,88-6,90 (m, 1H), 7,02-7,06 (m, 1H), 7,08-7,13 (m, 1H), 8,07 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H), 8,79 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H).

(continuación)

TABLA 3			
Ejemplo de síntesis química	Estructura (preparada mediante el procedimiento del ejemplo citado)	MS (ESI) <i>m/z</i>	Datos del espectro de RMN
116	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	415	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,50-1,53 (m, 2H), 1,86-1,89 (m, 2H), 2,82-3,95 (m, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,60-3,69 (m, 5H), 6,24 (s, 1H), 6,81 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,03 (s, 1H), 7,18-7,24 (m, 4H), 8,17 (t, <i>J</i> = 4,4 Hz, 1H).
117	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	444	RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1,62-1,68 (m, 2H), 2,01-2,03 (m, 2H), 2,96-3,06 (m, 3H), 3,55 (s, 3H), 3,71-3,74 (m, 5H), 3,81 (s, 3H), 6,36 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H), 6,65 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 6,93 (t, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H), 7,13 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H), 7,29-7,38 (m, 4H).
118	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1,84-1,89 (m, 2H), 2,12-2,16 (m, 2H), 3,13 (t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 2H), 3,31-3,41 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,84-3,86 (m, 2H), 6,79-6,82 (m, 1H), 6,93-7,00 (m, 2H), 7,38 (t, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H), 7,54 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H), 7,64 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 7,78 (s, 1H).
119	 <p>Preparada mediante el procedimiento del ejemplo 1</p>	434	RMN ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ 1,70-1,74 (m, 2H), 1,99-2,03 (m, 2H), 2,95 (t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 2H), 3,23-3,24 (m, 1H), 3,44 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,84-3,86 (m, 2H), 6,68-6,70 (m, 1H), 6,91-6,96 (m, 2H), 7,31-7,34 (m, 1H), 7,40-7,59 (m, 2H), 7,77-7,80 (m, 1H), 8,34 (m, 3H).

Preparación 120A: éster *terc*-butilico del ácido [1-(5-cloro-4-ciano-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-piperidin-4-il]-carbámico



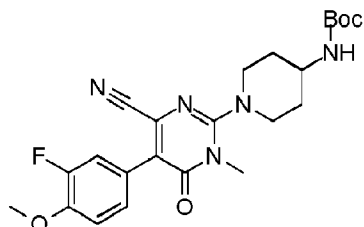
5

Una mezcla de N-[1-(5,6-dicloro-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-2-il))(4-piperidil)](*terc*-butoxi)carboxamida (2,4 g, 6,38 mmol), Zn(CN)₂ (388 mg, 3,32 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (740 mg, 0,64 mmol) en DMF (20 ml) se agitó a 130 °C durante 5 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se enfrió a TA y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 200 mg del producto del título (9 %). [M+H]⁺ calc. para C₁₆H₂₂ClN₅O₃, 368;

10

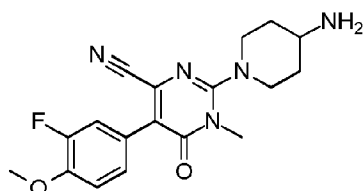
encontrado, 368.

Preparación 120B: éster *terc*-butílico del ácido {1-[4-ciano-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



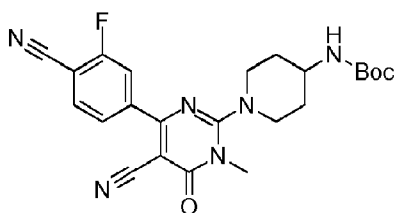
Una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido [1-(5-cloro-4-ciano-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il)-piperidin-4-il]-carbámico (200 mg, 0,54 mmol), ácido 3-fluoro-4-metoxibencenoborónico (278 mg, 1,63 mmol), Pd(dppf)₂Cl₂ (119 mg, 0,16 mmol) y Na₂CO₃ (173 mg, 1,63 mmol) en dioxano (5 ml) y H₂O (1 ml) se desgasificó con N₂ y se agitó a 145 °C en el microondas durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a TA y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 110 mg del producto deseado (45 %). [M+H]⁺ calc. para C₂₃H₂₈FN₅O₄, 458; encontrado, 458.

Ejemplo 120: 2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-carbonitrilo



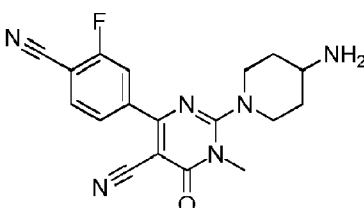
A una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido {1-[4-ciano-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (100 mg, 0,23 mmol) en EA (5 ml) se le añadió una solución 5 N de HCl en EA (5 ml), se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se concentró al vacío para dar 85 mg del producto del título en forma de la sal HCl (93 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,71-1,75 (m, 2H), 1,89-2,03 (m, 2H), 2,96-3,02 (m, 2H), 3,27-3,31 (m, 1H), 3,42 (s, 3H), 3,69-3,73 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 7,06 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,17-7,21 (m, 2H). [M+H]⁺ calc. para C₁₈H₂₀FN₅O₂, 358; encontrado, 358.

Preparación 121A: éster *terc*-butílico del ácido {1-[5-ciano-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



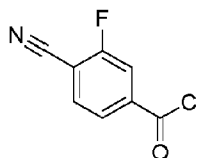
Una mezcla de éster *terc*-butílico del ácido {1-[5-cloro-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (460 mg, 1 mmol), Zn(CN)₂ (175 mg, 1,5 mmol) y Pd(PPh₃)₄ (116 mg, 0,01 mmol) en DMF (5 ml) se agitó 4 h a 150 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se enfrió a TA y se filtró. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 150 mg del producto del título en forma de un sólido de color amarillo (33 %). [M+H]⁺ calc. para C₂₃H₂₅FN₆O₃, 453; encontrado, 453.

Ejemplo 121: 2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-carbonitrilo



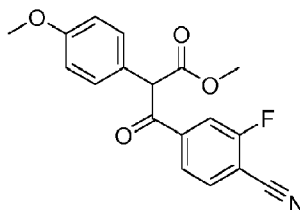
A una mezcla de éster *terc*-butilico del ácido {1-[5-ciano-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (150 mg, 0,33 mmol) en EA (5 ml) se le añadió una solución 5 N de HCl en EA (5 ml) y la mezcla se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se concentró al vacío para dar 120 mg el producto del título en forma de la sal HCl (94 %). RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,67-1,72 (m, 2H), 2,02-2,06 (m, 2H), 3,13-3,16 (m, 2H), 3,34-3,38 (m, 1H), 3,42 (s, 3H), 3,98-4,02 (m, 2H), 7,82-7,90 (m, 3H). [M+H] calc. para C₁₈H₁₇FN₆O, 353; encontrado, 353.

Preparación 122A: cloruro de 4-ciano-3-fluoro-benzoílo



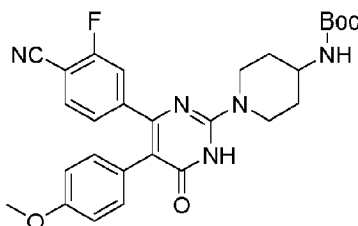
Una mezcla de ácido 4-ciano-3-fluoro-benzoico (2,0 g, 12,12 mmol) en SOCl₂ (20 ml) se calentó a reflujo durante 2 h, y el SOCl₂ se eliminó al vacío para dar cloruro de 4-ciano-3-fluoro-benzoílo (2,2 g, 99 %). El producto en bruto se llevó a la etapa siguiente sin más purificación.

Preparación 122B: éster metílico del ácido 3-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-2-(4-metoxi-fenil)-3-oxo-propiónico



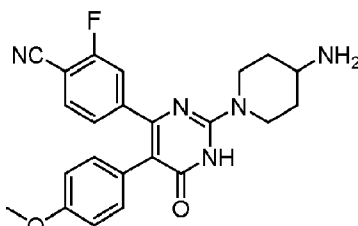
A una solución de ácido (4-metoxi-fenil)-acético (2,18 g, 12,12 mmol) en THF (20 ml) se le añadió LiHMDS (18,2 ml, 18,18 mmol) a -78 °C y la mezcla se agitó durante 30 min. Se añadió una solución de cloruro de 4-ciano-3-fluoro-benzoílo (2,2 g, 12 mmol) en THF gota a gota a -78 °C; y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó a hasta el día siguiente. Se añadió NH₄Cl acuoso y el producto acuoso se extrajo con EA (3x). Los extractos orgánicos combinados se concentraron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de sílice (1:5, EA:PE) para dar 1,8 g (45 %) del compuesto del título. [M+H] calc. para C₁₈H₁₄FN₂O₄, 328; encontrado, 328.

Preparación 122C: éster *terc*-butilico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico



Una mezcla de éster metílico del ácido 3-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-2-(4-metoxi-fenil)-3-oxo-propiónico (1,8 g, 5,5 mmol), éster *terc*-butilico del ácido (1-carbamimidol-piperidin-4-il)-carbámico (2,6 g, 9,2 mmol), DIEA (2,4 g, 18,3 mmol) en tolueno (50 ml) se calentó a reflujo hasta el día siguiente. El disolvente se concentró al vacío. El residuo se suspendió en MeOH y los sólidos se filtraron para dar 100 mg (4 %) del compuesto del título. [M+H] calc. para C₂₈H₃₀FN₅O₄, 520; encontrado, 520.

Ejemplo 122: 4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo



A una solución de éster *terc*-butílico del ácido {1-[4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il]-piperidin-4-il}-carbámico (50 mg, 0,096 mmol) en EA (10 ml) se le añadió una solución 5 M de HCl en EA y la mezcla se agitó a TA durante 2 h. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó por HPLC preparativa para dar 18 mg (40 %) del compuesto del título en la forma de la sal clorhidrato. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,81-1,87 (m, 2H), 2,22-2,25 (m, 2H), 3,34-3,38 (m, 2H), 3,56-3,60 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 4,61-4,64 (m, 2H), 6,86 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,08 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,37-7,38 (m, 1H), 7,51-7,53 (m, 1H), 7,74 (s, 1H). [M+H]⁺ calc. para C₂₃H₂₂FN₅O₂, 420; encontrado, 420.

II. Evaluación biológica

Los ejemplos que no se relacionan con el Compuesto A para su uso en el tratamiento del carcinoma de células de Merkel son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1a: Ensayo *in vitro* de Inhibición Enzimática - LSD-1

Este ensayo determina la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la actividad de la desmetilasa LSD-1. Se adquirió LSD-1 humana de longitud completa expresada en *E. coli* (número de registro 060341) en Active Motif (n.º de cat. 31334).

El ensayo enzimático de la actividad de la LSD-1 se basa en la detección de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia Resuelta en el Tiempo (TR-FRET, por las siglas del inglés *Time Resolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Las propiedades inhibitorias de los compuestos a la LSD-1 se determinaron en formato de placa de 384 pocillos en las siguientes condiciones de reacción: LSD-1 0,1-0,5 nM, péptido H3K4me1 marcado con biotina 50 nM (Anaspec n.º de cat. 64355), FAD 2 µM en tampón de ensayo de HEPES 50 mM, pH 7,3, NaCl 10 mM, Brij35 al 0,005 %, TCEP 0,5 mM, 0,2 mg/ml de BSA. El producto de reacción se determinó cuantitativamente mediante TR-FRET después de la adición del reactivo de detección Phycolink estreptavidina-aloficocianina (Prozyme) y del anticuerpo anti histona H3 lisina 4 (H3K4) no modificada conjugado con Europio (PerkinElmer) en presencia de inhibidor de LSD-1, tal como 1,8 mM de clorhidrato de tranilcipromina (2-PCPA) en tampón de detección LANCE (PerkinElmer) a una concentración final de 12,5 nM y 0,25 nM respectivamente.

La reacción del ensayo se realizó según el siguiente procedimiento: a cada uno de los pocillos de la placa se añadieron 2 µl de la mezcla de péptido H3K4me1 marcado con biotina 150 nM con 2 µl de compuesto de prueba diluido en serie 11 puntos en DMSO al 3 %, seguido de la adición de 2 µl de LSD-1 0,3 nM y 6 µM de FAD para iniciar la reacción. A continuación, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante una hora y finalizó con la adición de 6 µl de 2-PCPA 1,8 mM en tampón de detección LANCE que contenía Phycolink estreptavidina-aloficocianina 25 nM y anticuerpo anti H3K4 no modificada conjugado con Europio 0,5 nM. La reacción enzimática finalizaba en 15 minutos si en la placa se utilizaba enzima LSD-1 0,5. Las placas se leyeron con el lector EnVision Multilabel en modo TR-FRET (excitación a 320 nm, emisión a 615 nm y 665 nm) después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Se calculó una relación (665/615) para cada pocillo y se ajustó para determinar la constante de inhibición (CI₅₀).

Se cuantificó la capacidad de los compuestos desvelados en el presente documento para inhibir la actividad de la LSD-1 y se determinó el valor de CI₅₀ respectivo. En la Tabla 4 se proporcionan los valores de CI₅₀ de diversos compuestos heterocíclicos sustituidos desvelados en el presente documento.

TABLA 4		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	CI ₅₀ de LSD-1 (µM)
1	4-(2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-4-il)benzonitrilo	A
2	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
3	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
4	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
5	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
6	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
7	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A

(continuación)

TABLA 4		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de LSD-1 (μM)
8	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
9	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
10	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-etil-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
11	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
12	2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
13	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-etil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
14	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-ciclopentiletinil-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
15	ácido [2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético	A
16	2-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acetamida	A
17	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-(3-hidroxi-propil)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
18	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-benzofuran-5-il-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
19	2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-carbonitrilo	A
20	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-cloro-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
21	2-fluoro-4-[1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
22	4-[2-(2,8-diaza-espiro[4,5]dec-8-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
23	4-{2-(4-aminopiperidil)-1-metil-6-oxo-5-[6-(trifluorometil)(3-piridil)]hidropirimidin-4-il}-2-fluorobenzenocarbonitrilo	A
24	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]benzenocarbonitrilo	A
25	4-[2-((3R)-3-aminopiperidil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobenzenocarbonitrilo	A
26	4-[2-(4-aminopiperidil)-5-(5-fluoro-6-metoxi(3-5,6-dihidropiridil))-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobenzenocarbonitrilo	A
27	4-[2-((3R)-3-aminopirrolidinil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobenzenocarbonitrilo	A
28	4-[2-((3S)-3-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
29	4-[2-((3S)-3-amino-pirrolidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
30	4-[2-((3R)-3-aminopiperidil)-5-(4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobenzenocarbonitrilo	A
31	4-[2-((3S)-3-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
32	4-[2-(4-amino-4-metil-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
33	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(1-metil(1H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]benzenocarbonitrilo	A

(continuación)

TABLA 4		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de LSD-1 (µM)
34	4-{2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
35	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
36	4-{2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
37	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
38	4-[2-(4-aminopiperidil)-5-(3,5-difluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo	A
39	ácido 4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-ciano-3-fluorofenil)-3-metil-4-oxo-3-hidropirimidin-5-il]benzoico	B
40	{4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-cianofenil)-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-5-il)]-2-fluorofenil}-N-metilcarboxamida	A
41	4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-cianofenil)-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-5-il)]-2-fluorobenzamida	A
42	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-(1-oxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
43	ácido 3-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il]-benzoico	C
44	4-{5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3S)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
45	4-{5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3R)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
46	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
47	2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-piperazin-1-il-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
48	4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-4-ilamino)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
49	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-2'-dimetilamino-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-[5,5']bipirimidinil-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
50	metilamida del ácido 5-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il]-piridin-2-carboxílico	A
51	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3S)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
52	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3R)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
53	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-4-ilamino)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
54	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-(3S)-pirrolidin-3-ilmetil-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
55	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-piperidin-4-il-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
56	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-pirrolidin-3-ilmetil-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
57	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
58	2-fluoro-4-[5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
59	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-dimetilamino-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A

(continuación)

TABLA 4		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de LSD-1 (μM)
60	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-(6-pirrolidin-1-il-piridin-3-il)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
61	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
62	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
63	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
64	4-[2-(3-amino-azetidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
65	2-fluoro-4-[1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
66	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
67	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
68	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-morfolin-4-il-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
69	4-[2-(3-aminometil-azetidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
70	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(3-metilaminometil-azetidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
71	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
72	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
73	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indol-5-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
74	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
75	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
76	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indol-6-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
77	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indazol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
78	4-[2-((4R,3S)-4-amino-3-fluoro-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
79	4-[2-((4S,3R)-4-amino-3-fluoro-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
80	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-6-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
81	4-[2'-dimetilamino-2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-[5,5']bipirimidinil-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
82	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
83	4-[5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
84	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-5-(2H-indazol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
85	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil deuterado-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A

(continuación)

TABLA 4		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de LSD-1 (µM)
86	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi deuterado-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
87	2-fluoro-4-[1-metil-2-[4-(metilamino)piperidin-1-il]-5-(1-metilindazol-5-il)-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo	A
88	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(1H-indazol-5-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
89	4-[5-(4-aminofenil)-2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
90	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-5-[4-(metilamino)fenil]-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
91	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[3-fluoro-4-(metilamino)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
92	4-[2-[4-(dimetilamino)piperidin-1-il]-5-(6-metoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
93	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(6-etoxi-5-fluoropiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
94	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(6-etoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
95	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-etoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
96	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
97	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo	A
98	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-metoxietoxi)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
99	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxietil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
100	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(hidroximetil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
101	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-fluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
102	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
103	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3,5-difluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
104	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3,4-difluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
105	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-5-(4-metilsulfonilfenil)-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
106	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
107	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(metoximetil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
108	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
109	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-ciclopropilmetil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
110	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-ciclopropilmetil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
111	2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-cloro-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxifenil)-3-metil-3H-pirimidin-4-ona	B
112	2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-hidroxi-fenil)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-3H-	D

(continuación)

TABLA 4		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de LSD-1 (µM)
	pirimidin-4-ona	
113	2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-fluoro-fenil)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-3H-pirimidin-4-ona	B
114	2-(4-amino-piperidin-1-il)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-fenil-3H-pirimidin-4-ona	D
115	2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-3-metil-6-piridin-4-il-3H-pirimidin-4-ona	C
116	2-(4-amino-piperidin-1-il)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-piridin-4-il-3H-pirimidin-4-ona	B
117	2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-metoxi-fenil)-3-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-3H-pirimidin-4-ona	C
118	3-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo	D
119	2-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo	D
120	2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carbonitrilo	C
121	2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-5-carbonitrilo	B
122	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-1H-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
Nota: Los datos de Cl ₅₀ del ensayo bioquímico se designan dentro de los siguientes intervalos: A: ≤ 0,10 µM; B: > 0,10 µM a ≤ 1,0 µM; C: > 1,0 µM a ≤ 10 µM; D: > 10 µM		

La inhibición enzimática de la desmetilasa 1A específica de lisina por el Compuesto A se evaluó utilizando LSD1 o el complejo LSD1-CoREST (Informe QC6688 Pharm 1001). La Cl₅₀ del Compuesto A para la inhibición de la desmetilación inducida por LSD 1 y LSD1-CoREST de H3K4me1/2 se determinó mediante métodos de dilución en serie con los sustratos apropiados. El compuesto A era un inhibidor fuerte y selectivo de LSD1 solo o formando un complejo con CoREST, produciendo valores medios respectivos de Cl₅₀ ± DE de 0,25 ± 0,04 nM y 3,5 ± 0,55 nM. La preincubación con proteína LSD1 no afectó a la Cl₅₀ observada, lo que indica que la unión del compuesto A con LSD1 es reversible. Dado que el valor medio de Cl₅₀ para el complejo LSD1-CoREST estaba en el límite de detección inferior del método de ensayo, no fue posible determinar si las diferencias aparentes en la Cl₅₀ representan diferencias reales en la inhibición entre la forma libre y la que forma complejo de LSD1 (Tabla 5).

Tabla 5: Inhibición de la desmetilasa 1A específica de lisina y la desmetilasa 1A específica de lisina (K) - Correpresor del factor de transcripción silenciador de RE1 por el compuesto A.

Enzimas	Cl ₅₀ media (nM) [copias]	DE
LSD1	0,25 [4]	0,04
LSD1-CoREST	3,5 [6] ^a	0,55
CoREST = correpresor del factor de transcripción silenciador de RE1; LSD1 = desmetilasa 1A específica de lisina; Cl ₅₀ media = la concentración inhibidora media semimáxima de (n) experimentos independientes; DE = desviación estándar.		
^a Límite inferior Cl ₅₀ (-50 % de la concentración de LSD1-CoREST).		

El mecanismo inhibitor del Compuesto A contra LSD1 se estudió utilizando el sustrato H3K4me1 a diversas concentraciones. La correlación lineal entre el valor de Cl₅₀ y la concentración del sustrato indica que el Compuesto A es un inhibidor competitivo de LSD1 con una K_i de 0,12 nM.

Ejemplo 2: Ensayo *in vitro* de Inhibición Enzimática - selectividad de MAO

Se obtienen las proteínas monoamino oxidasas recombinantes humanas, MAO-A y MAO-B. Las MAO catalizan la desaminación oxidativa de los aminos primarias, secundarias y terciarias. Para controlar las actividades enzimáticas de las MAO y/o su tasa de inhibición con uno o más inhibidores de interés, se realiza un ensayo de exploración basado en fluorescencia (inhibidor). 3-(2-Aminofenil)-3-oxopropanamina (dihidrobromuro de quinuramina, Sigma Aldrich), se elige un compuesto no fluorescente como sustrato. La quinuramina es un sustrato inespecífico para las actividades de ambas MAO. Al mismo tiempo que experimenta desaminación oxidativa a través de las actividades de la MAO, la

quinuramina se transforma en 4-hidroxiquinolina (4-HQ), un producto fluorescente resultante.

La actividad de monoamina oxidasa se calculó midiendo la transformación de quinuramina en 4-hidroxiquinolina. Los ensayos se realizaron en placas negras de 96 pocillos con fondo transparente (Corning) en un volumen final de 100 µl.

5 El tampón de ensayo consistía en HEPES 100 mM, pH 7,5. Cada experimento se realizó por triplicado dentro del mismo experimento.

Resumiendo, durante 15 minutos se incubaba una cantidad fija de MAO (0,25 µg para la MAO-A y 0,5 µg para la MAO-B) en hielo en el tampón de reacción, en ausencia y/o en presencia de diversas concentraciones de compuestos como se desvela en el presente documento (por ejemplo, de 0 a 50 µM, dependiendo de la fuerza del inhibidor). Como control de la inhibición se utilizó tranilcipromina (Biomol International).

10

Después de dejar que la(s) enzima(s) interaccionase(n) con el compuesto de prueba, se añadieron de 60 a 90 µM de quinuramina a cada reacción en el ensayo de MAO-B y MAO-A respectivamente, y la reacción se dejó durante 1 hora a 37 °C en la oscuridad. La desaminación oxidativa del sustrato se detuvo añadiendo 50 µl de NaOH 2 N. La conversión de quinuramina en 4-hidroxiquinolina se controló mediante fluorescencia (excitación a 320 nm, emisión a 360 nm) utilizando un lector de microplacas (Infinite 200, Tecan). Se utilizaron unidades arbitrarias para medir los niveles de fluorescencia producidos en ausencia y/o en presencia del compuesto de prueba.

15

El máximo de actividad de desaminación oxidativa se obtuvo midiendo la cantidad de 4-hidroxiquinolina formada a partir de la desaminación de quinuramina en ausencia del compuesto de prueba y se corrigió por la fluorescencia de fondo. La constante K_i (CI_{50}) de cada inhibidor se determinó a $V_{m\acute{a}x}/2$. Los ejemplos de síntesis química 1-94, 101-106, 108-117 y 120-122 se probaron en el ensayo descrito anteriormente y se descubrió que tenían una CI_{50} mayor que 2 micromolar.

20

La selectividad del Compuesto A para la inhibición de LSD1 se estableció además en ensayos de exploración utilizando enzimas estrechamente relacionadas que contienen FAD: LSD2, MAO-A y MAO-B. El valor medio de CI_{50} determinado experimentalmente para la inhibición de LSD2 por el Compuesto A fue $16,550 \pm 6,378$ nM. Los valores medios de CI_{50} para la inhibición de MAO-A y MAO-B por el Compuesto A fueron > 20.000 nM. Estos resultados demuestran que el Compuesto A es más de 60.000 veces selectivo para LSD1 en comparación con LSD2, MAO-A o MAO-B (Tabla 6).

30

Tabla 6: Selectividad del Compuesto A por la Desmetilasa 1A específica de Lisina frente a la Desmetilasa 1B específica de Lisina, Monoaminoxidasa A y Monoaminoxidasa B

Enzimas	CI_{50} media (nM) [copias]	DE	Selectividad relativa de LSD1
LSD2	16550 [4]	6378	66200
MAO-A	> 20000 [2]	NC	> 80000
MAO-B	> 20000 [3]	NC	> 80000
LSD1	0,25 [4]	0,04	1
LSD1-CoREST	3,5 [6] ^a	0,55	14

CoREST = correpresor del factor de transcripción silenciador de RE1; LSD1(2) = desmetilasa 1A (1B) específica de lisina; CI_{50} media = la concentración inhibitoria media semimáxima de (n) experimentos independientes realizados en múltiples lotes de Compuesto A; MAO-A(B) = monoamino oxidasa A (B); NC = no calculado; DE = desviación estándar.

^a Límite inferior CI_{50} (~50 % concentración de LSD1-CoREST).

35 Ejemplo 3: Ensayo celular de cD11b para LSD-1

Para analizar la eficacia inhibitoria de la LSD-1 en las células, se realizó un ensayo de citometría de flujo de CD11b. La inhibición de LSD-1 induce la expresión de CD11b en células THP-1 (LMA) que se mide mediante citometría de flujo. En una placa de 24 pocillos, se sembraron células THP-1 a 100 000 células/pocillo en suero bovino fetal al 10 % que contenía medio RPMI 1640 con un volumen final de 500 µl por pocillo. Los compuestos de prueba de LSD-1 se diluyeron en serie en DMSO. Las diluciones se añadieron a cada pocillo conforme a una concentración final de DMSO al 0,2 %. Las células se incubaron a 37 grados centígrados (Celsius) en CO_2 al 5 % durante 4 días. Se transfirieron 250 µl de cada pocillo a un pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos. La placa se centrifugó a 1 200 rpm a 4 grados centígrados en una centrífuga Beckman Coulter Alegra 6KR durante 5 minutos. El medio se eliminó dejando las células en el fondo de los pocillos. Las células se lavaron en 100 µl de HBSS (siglas del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*, solución salina equilibrada de Hank) fría y una solución de BSA (*Bovine Serum Albumin*, seroalbúmina bovina) al 2 % y se centrifugaron a 1200 rpm a 4 grados centígrados durante 5 minutos. La solución de lavado se eliminó. Las células se resuspendieron en 100 µl de HBSS y BSA al 2 % que contenía una dilución 1:15 de anticuerpo anti-CD11b de ratón conjugado con APC (BD Pharmingen n.º de cat. 555751) y se incubaron en hielo durante 25 minutos. Las células se centrifugaron y lavaron dos veces en 100 µl de HBSS y BSA al 2 %. Después del centrifugado final, las células se resuspendieron en 100 µl de HBSS y BSA al 2 % que contenía DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 1 µg/ml. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo en un instrumento BD FACSAria. Las células se analizaron para determinar la expresión de CD11b. El porcentaje de células que expresaban CD11b a cada

50

concentración de inhibidor, se utilizó para determinar una curva de CI_{50} de cada compuesto analizado.

En la tabla 7 se proporcionan los valores de CI_{50} celulares de diversos compuestos heterocíclicos sustituidos divulgados en el presente documento.

5

TABLA 7		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	CI_{50} de THP-1 (μM)
1	4-(2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-4-il)benzonitrilo	A
2	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
3	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
4	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
5	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
6	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
7	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
8	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
9	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
10	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-etil-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
11	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
12	2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
14	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-ciclopentiletinil-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
15	ácido [2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acético	C
16	2-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-6-oxo-6H-pirimidin-1-il]-acetamida	A
18	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-benzofuran-5-il-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
20	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-cloro-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	B
22	4-[2-(2,8-diaza-espiro[4,5]dec-8-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
23	4-{2-(4-aminopiperidil)-1-metil-6-oxo-5-[6-(trifluorometil)-(3-piridil)]hidropirimidin-4-il}-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
24	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo	A
25	4-[2-((3R)-3-aminopiperidil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
26	4-[2-(4-aminopiperidil)-5-(5-fluoro-6-metoxi(3-5,6-dihidropiridil))-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
27	4-[2-((3R)-3-aminopirrolidinil)-5-(3-fluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
29	4-[2-((3S)-3-amino-pirrolidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B

(continuación)

TABLA 7		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de THP-1 (μM)
30	4-[2-((3R)-3-aminopiperidil)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
31	4-[2-((3S)-3-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
32	4-[2-(4-amino-4-metil-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
33	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(1-metil(1H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo	A
34	4-{2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-2-fluoro-benzonitrilo	A
35	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
36	4-{2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-benzonitrilo	A
37	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]-2-fluorobencenocarbonitrilo	A
38	4-[2-(4-aminopiperidil)-5-(3,5-difluoro-4-metoxifenil)-1-metil-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo	A
40	{4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-cianofenil)-3-metil-4-oxo(3-hidropirimidin-5-il)]-2-fluorofenil}-N-metilcarboxamida	B
41	4-[2-(4-aminopiperidil)-6-(4-cianofenil)-3-metil-4-oxo (3-hidropirimidin-5-il)]-2-fluorobenzamida	B
42	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-(1-oxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-il)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
44	4-{5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3S)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-benzonitrilo	B
45	4-{5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3R)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il}-benzonitrilo	B
46	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
47	2-fluoro-4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-piperazin-1-il-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
48	4-[5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-4-ilamino)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
49	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-2'-dimetilamino-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-[5,5']bipirimidinil-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
50	metilamida del ácido 5-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-4-(4-ciano-3-fluoro-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-5-il]-piridin-2-carboxílico	A
51	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3S)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
52	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-[(3R)-(pirrolidin-3-ilmetil)-amino]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
53	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-4-ilamino)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
54	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-(3S)-pirrolidin-3-ilmetil-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
55	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-piperidin-4-il-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
56	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(metil-pirrolidin-3-ilmetil-amino)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A

(continuación)

TABLA 7		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de THP-1 (µM)
57	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
58	2-fluoro-4-[5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
59	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-dimetilamino-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
60	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-(6-pirrolidin-1-il-piridin-3-il)-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
61	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
62	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
63	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
64	4-[2-(3-amino-azetidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
65	2-fluoro-4-[1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
66	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
67	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
68	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-morfolin-4-il-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
69	4-[2-(3-aminometil-azetidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
70	2-fluoro-4-[5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-2-(3-metilaminometil-azetidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
71	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
72	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
73	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indol-5-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
74	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
75	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
76	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indol-6-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
77	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(1H-indazol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
78	4-[2-((4R,3S)-4-amino-3-fluoro-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
79	4-[2-((4S,3R)-4-amino-3-fluoro-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
80	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-6-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
81	4-[2'-dimetilamino-2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-[5,5']bipirimidinil-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
82	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B

(continuación)

TABLA 7		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de THP-1 (μM)
83	4-[5-(6-dimetilamino-piridin-3-il)-1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
84	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-5-(2H-indazol-6-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
85	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil deuterado-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
86	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-deuteratedmetoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
87	2-fluoro-4-[1-metil-2-[4-(metilamino)piperidin-1-il]-5-(1-metilindazol-5-il)-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo	A
88	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(1H-indazol-5-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
89	4-[5-(4-aminofenil)-2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
90	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-5-[4-(metilamino)fenil]-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
91	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[3-fluoro-4-(metilamino)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
92	4-[2-[4-(dimetilamino)piperidin-1-il]-5-(6-metoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxo-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
93	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(6-etoxi-5-fluoropiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
94	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(6-etoxipiridin-3-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
95	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-etoxifenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
96	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
97	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]benzonitrilo	A
98	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-metoxietoxi)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
99	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(2-hidroxietil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
100	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(hidroximetil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
101	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-fluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
102	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3-fluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
103	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3,5-difluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
104	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(3,4-difluorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
105	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-5-(4-metilsulfonilfenil)-6-oxo-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
106	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
107	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-[4-(metoximetil)fenil]-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
108	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	B

(continuación)

TABLA 7		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de THP-1 (μM)
110	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-ciclopropilmetil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	B
111	2-(4-amino-piperidin-1-il)-6-(4-cloro-3-fluoro-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-3-metil-3H-pirimidin-4-ona	B
122	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(4-metoxifenil)-6-oxo-1H-pirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A
Nota: Los datos de Cl ₅₀ del ensayo celular se designan dentro de los siguientes intervalos: A: ≤ 0,10 μM; B: > 0,10 μM a ≤ 1,0 μM; C: > 1,0 μM a ≤ 10 μM; D: > 10 μM		

Ejemplo 4: Ensayo de proliferación con la línea celular Kasumi-1 de LMA (ensayo celular con MTS)

Ensayo celular colorimétrico para evaluar la capacidad de los inhibidores de molécula pequeña de LSD-1 para afectar a la proliferación de la línea celular de cáncer Kasumi-1 de LMA establecida.

Generalidades del ensayo

Se ha demostrado que la proteína LSD-1 desempeña un papel clave en la biología de una variedad de tipos de cáncer, incluidos el CPM y la LMA (leucemia mieloide aguda). Para demostrar la inhibición de moléculas pequeñas de LSD-1 como un posible tratamiento contra el cáncer, se implementó un ensayo para medir el grado de inhibición proliferativa en una línea celular de cáncer de LMA establecida.

Principio del ensayo

Este ensayo celular con MTS es un ensayo colorimétrico de 7 días basado en placa, que cuantifica la cantidad de NADH recién generado en presencia y ausencia del compuesto de prueba. Estos niveles de NADH se utilizan como una medida indirecta de cuantificación de la proliferación de células cancerosas.

Método de ensayo

La línea celular de cáncer Kasumi-1 establecida, con una mutación p53 confirmada, se adquirió en la colección americana de cultivos tipo (ATCC, *American Type Culture Collection*) y se traspasó de manera habitual según los protocolos publicados por la ATCC. Para el ensayo habitual, estas células se sembraron a una densidad de 20 000 células por placa de 96 pocillos. Setenta y dos (72) horas después de sembrar en placa, las células recibieron una dilución de 11 puntos del compuesto de prueba con intervalos de concentración final de 100 μM a 2,0 nM. Las células se incubaron en presencia del compuesto durante 168 horas a 37 °C, con CO₂ al 5 %. Al final de este período de incubación del compuesto, se eliminaron 80 μl de medio y se añadieron 20 μl de solución de ensayo de proliferación celular no radiactiva CellTiter 96® AQueous (Promega). Las células se incubaron hasta que la DO490 obtuvo un valor >0,6. Los valores de Cl₅₀ se calcularon utilizando el paquete informático IDBS XLfit e incluyeron los valores de DO490 sustraídos del fondo y la normalización a controles de DMSO.

En la Tabla 8 se proporcionan los valores de Cl₅₀ celulares de Kasumi-1 de diversos compuestos heterocíclicos sustituidos desvelados en el presente documento.

TABLA 8		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de Kasumi-1 (μM)
1	4-(2-(4-aminopiperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-p-tolil-1,6-dihidropirimidin-4-il)benzonitrilo	A
3	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
4	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(6-metil-piridin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	B
5	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A

(continuación)

TABLA 8		
Ejemplo de síntesis química	Nombre	Cl ₅₀ de Kasumi-1 (μM)
6	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
7	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(3-fluoro-4-metoxi-fenil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
8	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
9	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-5-(6-metoxi-piridin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
24	4-[2-(4-aminopiperidil)-1-metil-5-(2-metil(2H-indazol-5-il))-6-oxohidropirimidin-4-il]bencenocarbonitrilo	A
34	4-{2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
35	4-[2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(1-metil-1H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
36	4-{2-(4-amino-piperidin-1-il)-1-metil-6-oxo-5-[1-(2,2,2-trifluoro-etil)-1H-pirazol-4-il]-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
65	2-fluoro-4-[1-metil-2-(4-metilamino-piperidin-1-il)-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-benzonitrilo	A
66	4-[2-[1,4]diazepan-1-il-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
71	4-[2-(4-dimetilamino-piperidin-1-il)-1-metil-5-(2-metil-2H-indazol-5-il)-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidin-4-il]-2-fluoro-benzonitrilo	A
88	4-[2-(4-aminopiperidin-1-il)-5-(1H-indazol-5-il)-1-metil-6-oxopirimidin-4-il]-2-fluorobenzonitrilo	A

Ejemplo 5: Estudio Xenográfico *in Vivo* - Xenografía de MCF-7

- 5 Los sedimentos de liberación prolongada que contienen 0,72 mg de 17-β estradiol se implantan por vía subcutánea en ratones nu/nu. Se cultivaron células MCF-7 en RPMI que contenía FBS al 10 % con CO₂ al 5 % y a 37 °C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en RPMI (sin suero) al 50 % y Matrigel al 50 % a 1 x 10⁷ células/ml. Las células MCF-7 se inyectaron por vía subcutánea (100 μl/animal) en el costado derecho 2-3 días después de la implantación de las microesferas y el volumen tumoral (longitud x anchura²/2) se controló cada dos semanas. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de ~ 200 mm³ los animales se asignaron al azar y se inició el tratamiento. Los animales se trataron con vehículo o con compuesto diariamente durante 4 semanas. El volumen tumoral y el peso corporal se controlaron cada dos semanas durante todo el estudio. Al finalizar el período de tratamiento, se tomaron muestras de plasma y tumores para realizar los análisis farmacocinéticos y farmacodinámicos, respectivamente.

15 Ejemplo 6: Estudio Xenográfico *in Vivo* - Xenografía de LNCaP

- Células LNCaP con una atenuación génica (*knockdown*) estable de LSD-1 (células shLSD1) o células de control (tales como las células shNTC), se inocularon en el costado dorsal de ratones lampiños mediante inyección subcutánea (tal como 3 x 10⁶ células en 100 μl de RPMI 1640BD Matrigel al 50 %). El peso y el tamaño tumoral del ratón se midieron una vez por semana y el volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula (7i/6) (LxA), donde L = longitud del tumor y A = anchura del tumor. Se realizó una prueba de la t de dos muestras para determinar las diferencias estadísticas en el volumen tumoral medio entre los dos grupos.

- 25 Las células LNCaP no modificadas se inocularon mediante inyección subcutánea en el costado dorsal de ratones lampiños (tal como 3 x 10⁶ células en 100 μl de RPMI 1640BD Matrigel al 50 %). Después de tres semanas, se inyectó por vía intraperitoneal a los ratones una vez al día con agua (control), pargilina (0,53 mg o 1,59 mg; concentración final de 1 o 3 mM, suponiendo una biodisponibilidad del 70 %), o XB154 (4 o 20 μg; concentración final de 1 o 5 μM, suponiendo una biodisponibilidad del 70 %) o se trataron con un compuesto de prueba (5 mg/kg cada semana o 10 mg/kg cada semana). El tratamiento continuó durante tres semanas, tiempo durante el cual se midió el peso y el volumen tumoral del ratón como se ha indicado anteriormente.

Se inyectaron células LNCaP shLSD1 o células de control a ratones lampiños como se ha indicado anteriormente. Después de tres semanas, los ratones se trataron con 2,6 μg de mitomicina C (concentración final prevista de 1 μM

suponiendo una biodisponibilidad del 40 %), olaparib (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mg/kg a 25 mg/kg) o vehículo, por vía intraperitoneal, una vez al día durante tres semanas. En otros ejemplos, se inyectaron células LNCaP no modificadas a ratones lampiños como se ha indicado anteriormente.

- 5 Después de tres semanas, los ratones se trataron con los compuestos de prueba, o vehículo como se ha indicado anteriormente, y MMC u olaparib. El tratamiento continuó durante tres semanas, tiempo durante el cual se midió el peso y el volumen tumoral del ratón como se ha indicado anteriormente.

- 10 Una disminución del volumen tumoral en comparación con el control en ratones que recibieron inyección de células shLSD-1 indica que la inhibición de LSD-1 disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*.

- 15 De manera similar, una disminución del volumen tumoral en comparación con el control en ratones que recibieron inyección de células LNCaP y tratados con un compuesto desvelado en el presente documento, indica que la inhibición de LSD-1 disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*. Finalmente, una disminución del volumen tumoral en ratones que recibieron inyección de células LNCaP y tratados con un compuesto desvelado en el presente documento y olaparib en comparación con ratones tratados solo con un compuesto desvelado en el presente documento, indica que la inhibición de LSD-1 y la inhibición de PARP disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*.

- 20 Para comprobar la inhibición de LSD-1 se examinó tejido de xenoinjerto extraído. Esto se evaluó mediante transferencias de Western para examinar los niveles globales de las marcas de histonas 2MK4 y 2MK9, la expresión de genes FA/BRCA, la ubiquitinación de FANCD2 y los niveles de proteína LSD-1 en los casos de células con ARNhc. Una disminución de uno o más de estos parámetros indica la inhibición eficaz de LSD-1. De manera adicional, los efectos sobre la restauración de daños en el ADN se evaluaron mediante tinción de focos de H2AX.

- 25 Ejemplo 7: Actividad antiproliferativa en fibroblastos humanos normales y en células de cáncer de pulmón microcítico

- Se investigó el efecto del Compuesto A sobre la viabilidad celular en varias líneas celulares CPM del NCI establecidas (Informe QC6688-Pharm-1002). Se midieron los valores de concentración inhibidora media máxima de IMR-90, de la línea celular de fibroblastos humanos normales y de un panel de 6 líneas celulares de CPM en los respectivos intervalos de concentración de 0,17 a 10.000 nM y de 0,7 a 500 nM para el Compuesto A. El Compuesto A demostró una fuerte actividad antiproliferativa en 5 de las 6 líneas celulares de CPM que se analizaron. En la línea celular NCI-H69, NCI-H146, NCI-H209, NCI-H526, y en las líneas celulares NCI-H1417, el compuesto A mostró valores medios respectivos de $CI_{50} \pm DE$ de $7,0 \pm 2,5$ nM, $9,9 \pm 9,6$ nM, $3,9 \pm 0,2$ nM, $36,4 \pm 28,8$ nM y $14,6 \pm 12,6$ nM. El compuesto A tuvo un efecto limitado sobre la proliferación celular en la línea celular de CPM NCI-H841, dando un valor de CI_{50} de > 500 nM. El compuesto A no mostró ningún efecto sobre la proliferación celular en la línea celular de fibroblastos humanos normales IMR-90 a las concentraciones analizadas (valor de $CI_{50} > 10.000$ nM) (Tabla 9).

Tabla 9: Valores de inhibición media máxima del compuesto A para las líneas celulares de fibroblastos humanos normales y de cáncer de pulmón microcítico

Línea Celular	CI_{50} media (nM)	DE	n	pCI_{50}	Formato	Lector
IMR-90	> 10000	NC	1	< 5,0	ensayo 2D a	CellTiter 96® Aqueous
NCI-H69	7,0	2,5	3	8,2	Ensayo 3D b	Calceína AM
NCI-H 146	9,9	9,6	3	8,0	Ensayo 3D b	Calceína AM
NCI-H209	3,9	0,2	2	8,4	Ensayo 3D b	Calceína AM
NCI-H526	36,4	28,8	3	7,4	Ensayo 3D b	Calceína AM
NCI-H1417	14,6	12,6	2	7,8	ensayo 2D a	CellTiter-Glo®
NCI-H841	> 500	NC	3	< 6,3	Ensayo 3D b	Calceína AM

2 (o 3) D = bi (o tri) dimensional; CI_{50} media = la concentración inhibidora media semimáxima de (n) experimentos independientes; NC = no calculado; $pCI_{50} = -\log_{10}(CI_{50} \text{ media})$ en mol/l; DE = desviación estándar.

a Ensayo 2D = ensayo con células adheridas a una superficie sólida bidimensional (2D).

b Ensayo 3D = ensayo con células suspendidas en una matriz extracelular tridimensional (3D).

- 40 Ejemplo 8: Efecto sobre el biomarcador farmacodinámico péptido liberador de gastrina en células de cáncer de pulmón microcítico

- Se demostró que la inhibición de la desmetilasa 1A específica de lisina modula la expresión de genes relacionados con tumores neuroendocrinos, como el PLG (péptido liberador de gastrina) humano, en líneas celulares de CPM. El efecto de la inhibición de LSD1 mediada por el Compuesto A sobre la expresión del PLG en las líneas celulares de CPM humano, NCI-H1417, NCI-H209 y NCI-H69, se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR). Después del período de incubación, se extrajo ARN total y se midieron los factores de cambio en los niveles de PLG mediante qRT-PCR. La CI_{50} para la inhibición del Compuesto A de la expresión de PLG se determinó calculando el cambio porcentual en la expresión del ARNm de PLC frente a la concentración respectiva del Compuesto A (con relación al control de DMSO). Porcentaje de control =

100 × 2- $\Delta\Delta C_t$, Los niveles de ARNm de PLG después del tratamiento se normalizaron a una transcripción genética de mantenimiento. El tratamiento con el Compuesto A dio como resultado una regulación negativa dependiente de la concentración de los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de PLG en células NCI-H1417, células NCI-H209 y NCI-H69, dando valores respectivos de $CI_{50} \pm DE$ de $8,9 \pm 4,6$ nM, $7,2 \pm 4,7$ nM y $6,0 \pm 3,8$ nM (FIG. 1).

De manera adicional, se investigó la unión de LSD1 al locus del gen PLG en las líneas celulares de CPM NCI-H69 y NCI-H209 utilizando ChIP-seq. Los resultados de secuenciación e inmunoprecipitación de cromatina mostraron que LSD1 ocupa conjuntamente elementos potenciadores, identificados como regiones positivas para H3K4me1, que están dentro de 100 kilobases del locus del gen PLG. Estos resultados sugieren que LSD1 se une a posibles sitios reguladores del locus del PLG y que LSD1 puede regular directamente la expresión del gen PLG, confirmando así que el PLG es un biomarcador farmacodinámico (FD) de la inhibición de LSD1 en CPM (FIG. 2).

Ejemplo 9: Efecto de la inhibición de la desmetilasa 1A específica de lisina por el compuesto A sobre la expresión del ácido ribonucleico mensajero del péptido liberador de gastrina humana en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón microcítico NCI-H1417

Para traducir los efectos de la inhibición de LSD1 mediada por el Compuesto A observados en un entorno *in vitro* e *in vivo*, se midieron los cambios de ICT y de expresión del gen diana después del tratamiento con el Compuesto A en varios modelos de CPM *in vivo*. La modulación de la expresión del PLG humano, después de la inhibición de LSD1 por el Compuesto A, se evaluó en un modelo de xenoinjerto de CPM humano NCI-H1417 en ratones lampiños, atímicos. Por vía oral se trataron ratones hembra portadores de tumores de CPM NCI-H1417 implantados por vía SC, con el Compuesto A a 2,5, 5 o 10 mg base/kg UVD durante 4 días y se determinaron los niveles de expresión de PLG. El tratamiento con el Compuesto A dio como resultado una regulación negativa relacionada con la dosis de los niveles de ARNm de PLG en los ratones portadores de tumores tratados, en comparación con los animales de control tratados con vehículo, según lo determinado por qRT-PCR. Comparando valores medios de expresión, el compuesto A a 2,5, 5 y 10 mg base/kg, redujo la expresión del gen PLG en un 44 %, 53 % y 56 %, respectivamente, en relación con los animales de control. La disminución de la expresión del gen PLG fue estadísticamente significativa para dosis de Compuesto A ≥ 5 mg base/kg ($p \leq 0,05$) (FIG. 3).

Ejemplo 10. Eficacia del compuesto A en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón microcítico NCI-H1417

La eficacia y tolerabilidad del Compuesto A se evaluaron en un modelo SC de xenoinjerto CPM humano NCI-H1417 en ratones hembra lampiños, atímicos. Ratones hembra portadores de tumores de CPM NCI-H1417 recibieron por vía oral dosis de UVD durante 65 días consecutivos (UVDx65) de 2,5 o 5 mg base/kg de Compuesto A o 10 ml/kg de vehículo de metilcelulosa al 0,5 % como control. El análisis de inhibición del crecimiento tumoral el día 65 demostró que el tratamiento con el Compuesto A era eficaz en el modelo NCI-H1417, dando como resultado una ICT de 159 % a una dosis de 2,5 mg base/kg ($p \leq 0,001$) y de 178 % a una dosis de 5 mg base/kg ($p \leq 0,0001$) (Tabla 10). Seis de siete animales de control mostraron un aumento en el volumen tumoral neto al final del estudio. A la inversa, todos menos 1 tumor (14 de 15) de los animales tratados con el Compuesto A, experimentaron una regresión del volumen neto. El crecimiento tumoral medio de los animales de control avanzó a lo largo del estudio, mientras que los tumores en los 2 grupos tratados con el Compuesto A, disminuyeron después del día 14 (FIG. 4). El compuesto A pareció tolerarse bien y los animales que recibieron dosis de 2,5 o 5 mg base/kg mostraron aumentos de peso corporal medios respectivos del 1 % y del 7,5 % al final del estudio. Todos los animales sobrevivieron a la duración del estudio.

Tabla 10. Resumen de respuestas del estudio NCI-H1417

Grupo	n	Régimen de tratamiento			Volumen tumoral medio (mm ³)					Significado estadístico
		Agente	Dosis (mg base/kg)	Vía	Pauta	Día 0	Día 65	Dif.	% de ICT	
1	7	Vehículo	0	PO	UVDx65	105,3	223,6	118,3	NC	NC
2	7	Compuesto A	2,5	PO	UVDx65	109,2	39,3	-69,9	159 %	$p \leq 0,001$
3	8	Compuesto A	5	PO	UVDx65	108,2	15,9	-92,3	178 %	$p \leq 0,0001$

ANOVA = análisis de varianza; Dif. = diferencia; NC = no calculado; PO = dosificación oral; UVD = dosificación una vez al día;
 ICT = inhibición del crecimiento tumoral.
 Observación: El valor de p se calculó usando ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Compuesto A frente a vehículo).

Ejemplo 11: Eficacia del compuesto A en Modelos de xenoinjerto procedentes de pacientes con cáncer de pulmón microcítico LU2514 y LU1480 HuPrime®

5 El compuesto A se evaluó en los modelos de LU2514 y LU1480 HuPrime de CPM procedentes de pacientes, que se implantaron SC en ratones hembra BALB/c lampiños.

10 En el estudio LU2514, los ratones hembra tratados recibieron el Compuesto A a 10 mg base/kg ($n = 10$) o a 5 mg base/kg ($n = 8$), por vía oral, UVD durante 28 días (UVDx28). El análisis de inhibición del crecimiento tumoral se realizó el día 28 después del tratamiento, el último día de dosificación. El compuesto A fue eficaz, causando una ICT de 61 % y 43 % a 10 mg base/kg y a 5 mg base/kg, respectivamente ($p \leq 0,01$) (Tabla 11). El crecimiento del tumor se redujo en ambos grupos tratados con el Compuesto A con respecto a los animales de control (FIG. 5).

Tabla 11: Resumen de respuestas del estudio QC-TR-L021 (LU2514)

Grupo	n	Régimen de tratamiento			Volumen tumoral medio (mm ³)					Significado estadístico
		Agente	Dosis (mg base/kg)	Vía	Pauta	Día 1	Día 28	Dif.	% de ICT	
1	10	Vehículo ^a	0	PO	DVDx28	166,6	2046,5	1879,9	NC	NC
2	10	Compuesto	10	PO	UVDx28	173,7	906,0	732,3	61 %	$p \leq 0,01$
3	8	Compuesto	5	PO	UVDx28	173,2	1244,8	1071,6	43 %	$p \leq 0,01$

DVD = dos veces al día; Dif. = diferencia; NC = no calculado; PO = dosificación oral; UVD = dosificación una vez al día; ICT = inhibición del crecimiento tumoral.
^a El vehículo se administró DVD para igualar regímenes de dosificación adicionales no incluidos en esta tabla. Duración del estudio = 70 días. ICT determinada el día 28, el último día de dosificación.

- 5 En el estudio LU2514, el Compuesto A administrado por vía oral a 10 mg base/kg durante 22 días produjo una ICT del 62 %. El crecimiento tumoral medio en el grupo tratado con el Compuesto A se redujo con respecto a los animales de control. El análisis histológico reveló que los tumores del animal de control mostraban una morfología clásica de células redondas poco diferenciadas y cromatina granular. Los tumores de los animales tratados con el Compuesto A mostraron células con una estructura "más laxa", una disminución de la relación núcleo-citoplasma y un mayor número de cuerpos apoptóticos (FIG. 6). En ambos estudios con el modelo animal LU2514, el Compuesto A pareció tolerarse bien con pérdidas de peso corporal medio <10 %.
- 10 En el estudio de LU1480, la administración oral del Compuesto A durante 21 días fue eficaz, logrando una ICT de 72 % con dosis de 10 mg base/kg ($p \leq 0,001$) y de 53 % con dosis de 5 mg /kg ($p \leq 0,01$) (Tabla 12). El crecimiento tumoral medio en los grupos tratados con el Compuesto A se redujo con respecto al de los animales de control (FIG. 7). En el experimento LU1480, el Compuesto A administrado por vía oral a 10 mg base/kg durante 15 días produjo una ICT del 46 %. En estos estudios LU1480, se notificó una pérdida de peso corporal generalizada y sostenida, probablemente debida a la naturaleza caquéctica intrínseca al modelo LU1480.

Tabla 12: Resumen de respuestas del estudio LU1480

Grupo	n	Régimen de tratamiento				Volumen tumoral medio (mm ³)				Significado estadístico
		Agente	Dosis (mg base/kg)	Vía	Pauta	Día 1	Día 21	Dif.	% de ICT	
1	10	Vehículo ^a	0	PO	DVDx21	89,1	934,5	845,4	NC	NC
2	10	Compuesto	10	PO	UVDx21	87,1	321,4	234,3	72 %	$p \leq 0,001$
3	8	Compuesto	5	PO	UVDx21	89,5	490,1	400,6	53 %	$p \leq 0,01$

DVD = dos veces al día; Dif. = diferencia; NC = no calculado; PO = dosificación oral; UVD = dosificación una vez al día; ICT = inhibición del crecimiento tumoral.
^a El vehículo se administró DVD para igualar regímenes de dosificación adicionales no incluidos en esta tabla.
Duración del estudio = 66 días; La ICT se determinó después de 21 dosis, el último día cuando quedaban al menos 8 animales en cada grupo de estudio.

Resumiendo, cuando el Compuesto A se dosifica por vía oral a 5 o 10 mg /kg, demuestra ser eficaz en los modelos LU2514 y LU1480 PDX de CPM. La ICT relacionada con la dosis (43 % a 72 %) de los animales tratados con el Compuesto A frente a la de los animales control fue estadísticamente significativa en todos los estudios excepto en

5 LU2514, donde el tamaño de la muestra era pequeño.

Ejemplo 12: Eficacia del compuesto A en LXFS 573, LXFS 615, Modelos de xenoinjerto procedentes de pacientes con cáncer de pulmón microcítico LXFS 1129 y LXFS 2156

- 10 Los efectos antitumorales del Compuesto A administrado por vía oral también se evaluaron en 4 modelos diferentes de CPM PDX, LXFS 573, LXFS 615, LXFS 1129 y LXFS 2156, que se implantaron SC en ratones hembra inmunodeficientes NMRI-Foxn1nu. El tratamiento con el Compuesto A fue eficaz en el modelo LXFS 573 PDX de CPM, alcanzando una ICT al final del estudio (día 28) del 78 % con una dosis de 5 mg base/kg ($p \leq 0,001$), del 58 % con dosis de 7,5 mg base/kg ($p \leq 0,01$) y del 71 % con dosis de 10 mg/kg ($p \leq 0,001$) (Tabla 13). El crecimiento tumoral
- 15 medio en los grupos tratados con el Compuesto A se redujo con respecto al de los animales de control después del día 10 (FIG. 8). El compuesto A pareció tolerarse bien con pérdidas de peso corporal medio ≤ 3 %.

Tabla 13: Resumen de respuestas del experimento LXFS 573

Grupo	n	Régimen de tratamiento			Volumen tumoral medio (mm ³)					Significado estadístico
		Agente	Dosis (mg base/kg)	Vía	Pauta	Día 0	Día 28	Dif.	% de ICT	
1	8	Vehículo	0	PO	UVDx28	117,2	1037,3	920,1	NC	NC
2	8	Compuesto	5	PO	UVDx28	108,4	308,3	199,9	78 %	$p \leq 0,001$
3	8	Compuesto	7,5	PO	UVDx28	113,2	496,6	383,4	58 %	$p \leq 0,01$
4	8	Compuesto	10	PO	UVDx28	113,8	376,8	263,0	71 %	$p \leq 0,001$

ANOVA = análisis de varianza; Dif = diferencia; NC = no calculado; PO = dosificación oral; UVD = dosificación una vez al día; ICT = inhibición del crecimiento tumoral.
 Observación: mediante un ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett en caso de experimentos con más de dos grupos y la prueba de la t para datos independientes en caso de experimentos donde se comparan dos grupos, se evaluaron las diferencias en la distribución de los volúmenes tumorales en los animales tratados con el Compuesto A frente a los animales de control.

En el modelo LXFS 615 PDX, la administración oral del Compuesto A a 5 mg base/kg durante 30 días causó un 78 % de ICT ($p \leq 0,001$). El crecimiento tumoral medio en el grupo tratado con el Compuesto A se redujo con respecto al de los animales de control (FIG. 9). El compuesto A pareció tolerarse bien con pérdidas de peso corporal medio <1 %. El análisis farmacocinético realizado en muestras de plasma recogidas después de la dosis final demostró que el ABC_{0-24} del Compuesto A a 5 mg base/kg fue de 1,617 ng•h/ml.

La administración del Compuesto A, UVD durante 30 días, fue eficaz en el modelo LXFS 1129 PDX de CPM, logrando una ICT al final del estudio del 89 % a una dosis de 5 mg base/kg ($p \leq 0,001$) y del 55 % a una dosis de 1,5 mg base/kg ($p < 0,05$). Después del día 12, el crecimiento tumoral medio en ambos grupos tratados con el Compuesto A se redujo con respecto al de los animales de control (FIG. 10). El compuesto A pareció tolerarse bien con pérdidas de peso corporal medio <6 %. Los valores de ABC_{0-24} del Compuesto A a una dosis de 1,5 y de 5 mg base/kg fueron 243 y 1262 ng•h/ml, respectivamente, y por lo tanto, se observó un aumento mayor que proporcional en la exposición a la dosis de 5 mg base/kg en relación con la dosis de 1,5 mg base/kg.

Cuando el Compuesto A se administró por vía oral UVDx23 a 5 mg base/kg, no fue eficaz en el modelo LXFS 2156 PDX, con una ICT de -7 %.

Resumiendo, la administración oral del Compuesto A fue eficaz en los modelos LXFS 573, LXFS 615 y LXFS 1129 PDX de CPM. El nivel de ICT (del 55 % al 89 %) para los animales tratados con el Compuesto A frente al de los animales de control, fue significativo. El compuesto A pareció tolerarse bien en los 4 modelos analizados, con pérdidas de peso corporal <6 %.

Ejemplo 13. Eficacia *in vivo* del compuesto A en los modelos LU2527 y GA0087 de xenoinjerto procedente de pacientes con carcinoma neuroendocrino gástrico y de pulmón subcutáneo HuPrime® respectivos, en ratones hembra lampiños BALB/c

La eficacia y tolerabilidad *in vivo* del Compuesto A se evaluaron preclínicamente siguiendo una pauta de administración de una vez al día (UVD) utilizando los respectivos modelos de xenoinjerto subcutáneo procedente de pacientes (PDX, *patient-derived xenograft*) de carcinoma neuroendocrino gástrico (CNE) y de pulmón de HuPrime® LU2527 y GA0087, establecidos en ratones hembra lampiños BALB/c inmunodeficientes. LU2527 y GA0087 se caracterizaron como un carcinóide atípico de pulmón y un carcinóide del cardias gástrico, respectivamente. La eficacia se determinó en función del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) y en las diferencias entre los animales tratados y los de control en los volúmenes tumorales netos medios el día del análisis de la ICT y en el crecimiento tumoral medio a lo largo del estudio. La tolerabilidad se evaluó basándose en las diferencias del peso corporal medio entre los animales tratados y los de control.

Se obtuvieron fragmentos de tumor LU2527 de xenoinjertos realizados con pases en serie (R3P6) en ratones madre. Después de extraerlos de los ratones donantes, los tumores se cortaron en fragmentos (de 2 a 3 mm de diámetro) y se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones BALB/c inmunodeficientes hembra receptores. Se permitió que los tumores crecieran durante 50 días hasta que alcanzaron ~ 159 mm³. Después, se asignaron al azar ratones portadores de tumores (de 11 a 12 semanas de vida) en tres grupos de ocho ratones con volúmenes tumorales medios de $159,7 \pm 13,6$ mm³, $159,7 \pm 13,9$ mm³ y $159,7 \pm 13,5$ mm³. Este día se denominó Día 0 y la dosificación se inició según el régimen predeterminado que se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Plan de tratamiento para LU2527

Grupo	n	Régimen de tratamiento			
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta
1 ^a)	8	Vehículo	-	PO ^b	UVD ^c × 57
2	8	compuesto A	1,5	PO	UVD × 57
3	8	compuesto A	5	PO	UVD × 57

^a) el grupo de control recibió una dosis de 10 ml/kg de vehículo solo y el Compuesto A recibió una dosis de 10 ml/kg como equivalentes de base libre en mg/kg;
^b) dosificación oral (PO); ^c) dosificación una vez al día (UVD)

Se obtuvieron fragmentos de tumor GA0087 de xenoinjertos realizados con pases en serie (R15P7) en ratones madre. Después de extraerlos de los ratones donantes, los tumores se cortaron en fragmentos (de 2 a 3 mm de diámetro) y se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho de ratones BALB/c inmunodeficientes hembra receptores. Se permitió que los tumores crecieran durante 24 días hasta que alcanzaron ~ 133 mm³. Después, se asignaron al azar ratones portadores de tumores (de 13 a 14 semanas de vida) en tres grupos de ocho ratones con volúmenes tumorales medios de $133,2 \pm 7,6$ mm³, $133,0 \pm 7,8$ mm³, y $133,1 \pm 8,5$ mm³. Este día se denominó Día 0 y la dosificación se inició según el régimen predeterminado que se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Plan de tratamiento para GA0087

Grupo	n	Régimen de tratamiento			
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta
1 ^{a)}	8	Vehículo	-	PO ^{b)}	UVD ^{c)} × 62
2	8	compuesto A	1,5	PO	UVD × 62
3	8	compuesto A	5	PO	UVD × 62

a) el grupo de control recibió una dosis de 10 ml/kg de vehículo solo y el Compuesto A recibió una dosis de 10 ml/kg como equivalentes de base libre en mg/kg;
b) dosificación oral (PO); c) dosificación una vez al día (UVD)

Los tumores individuales se midieron dos veces a la semana en dos dimensiones usando un calibrador y se calcularon los volúmenes de los tumores (VT) en mm³ usando la fórmula: $VT = 0,5 a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto en milímetros, respectivamente. Los animales se pesaron dos veces a la semana. Se construyeron curvas de crecimiento tumoral medio y gráficos de peso corporal medio como cambio porcentual desde el día 0.

El porcentaje de ICT se calculó utilizando la mediana de los volúmenes tumorales según la siguiente fórmula:

$$ICT_x [\%] = \left(1 - \frac{T_x - T_0}{C_x - C_0}\right) \times 100$$

donde T_0 y C_0 fueron las respectivas medianas de los volúmenes tumorales en los grupos tratados con el Compuesto A y de control antes del inicio de la dosificación y T_x y C_x fueron las correspondientes medianas de los volúmenes tumorales del Día "x", el día del análisis de la ICT.

Las ICT en los estudios LU2527 y GA0087 se calcularon el día 46 y el día 53, respectivamente, el último día en que se dispuso de mediciones del volumen tumoral de todos los animales tratados con el compuesto A. En ambos estudios, un animal de cada grupo de control fue objeto de censura estadística debido a un injerto tumoral deficiente y, en el estudio de LU2527, un segundo animal de control que salió del estudio el día 21 fue objeto de censura estadística debido a muerte accidental, posiblemente debida a un error de alimentación por sonda oral. En el estudio de GA0087, un animal que recibió 1,5 mg/kg del compuesto A alcanzó el criterio de valoración del volumen tumoral (≥ 3000 mm³) el día 53 pero no se sacrificó hasta el día 57. Como resultado, la medición del día 56 fue objeto de censura estadística, estableciendo el día 53 como el día del análisis de la ICT.

En las tablas se resumen los respectivos planes de tratamiento de los estudios LU2527 y GA0087. Para cada tipo de tumor, los animales de prueba se clasificaron en tres grupos de ocho ratones por grupo y los tratamientos se iniciaron el día 0 cuando el tamaño promedio del tumor cumplía con los criterios de aleatorización. Los ratones de control recibieron un vehículo de metilcelulosa al 0,5 % a 10 ml/kg de peso corporal administrado mediante sonda oral (PO) siguiendo una pauta de una vez al día (UVD), como se muestra. Los ratones tratados recibieron el Compuesto A a una dosis de 10 ml/kg dosificada como equivalentes de base libre en mg/kg, PO, siguiendo las pautas de UVD como se muestra. Dos animales de cada estudio tuvieron un descanso farmacológico, que no tuvo ningún efecto sobre los resultados. El artículo de prueba, el Compuesto A, se preparó diariamente como una sal (74 % de compuesto activo) suspendida en un vehículo.

Los resultados del estudio LU2527 se muestran en la Tabla 16. Cuando el compuesto A se administró por vía oral UVD durante 46 días, produjo ICT dependientes de la dosis del 51 % con 1,5 mg/kg y del 84 % con 5 mg/kg en el modelo LU2527 PDX de cáncer de pulmón. Como se muestra en la FIG. 11, la diferencia en los volúmenes tumorales netos medios el día del análisis de la ICT para los animales tratados con 5 mg/kg de Compuesto A frente a los animales de control, fue significativa ($p = 0,0001$). El crecimiento tumoral medio en el grupo tratado con 5 mg/kg del Compuesto A se redujo considerablemente en relación con los animales de control, como se muestra en la FIG. 12. El compuesto A pareció tolerarse aceptablemente mostrando cambios de peso corporal medio que no diferían sustancialmente de los del control del vehículo, como se muestra en la FIG. 13. Se produjeron pérdidas progresivas de peso corporal medio en todos los grupos, incluido el grupo de control tratado con vehículo, después del día del análisis de la ICT, lo que sugiere que la pérdida de peso corporal puede estar relacionada con la carga tumoral.

Tabla 16. Resumen de respuesta para LU2527 el día 46

Grupo	n	Régimen de tratamiento			Volumen tumoral medio (mm ³)					Significado estadístico
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta	Día 0	Día 46	Dif	% de ICT	
1 ^{a)}	6	Vehículo	-	PO ^{b)}	UVD ^{c)} × 46	148,7	1269,8	1121,2	~	~
2	8	Compuesto A	1,5	PO	UVD × 46	148,2	698,5	550,3	51	p = 0,0542
3	8	Compuesto A	5	PO	UVD × 46	151,8	329,7	177,9	84	p = 0,0001

^{a)} el grupo de control recibió una dosis de 10 ml/kg de vehículo solo y el Compuesto A recibió una dosis de 10 ml/kg como equivalentes de base libre en mg/kg;

^{b)} dosificación oral (PO); ^{c)} dosificación una vez al día (UVD)

Los resultados del estudio GA0087 se muestran en la Tabla 17. Cuando el compuesto A se administró por vía oral UVD durante 53 días, produjo ICT del 53 % a 1,5 mg/kg y del 56 % a 5 mg/kg en el modelo GA0087 PDX de cáncer gástrico. Como se muestra en la FIG. 14, las diferencias en los volúmenes tumorales netos medios el día del análisis de la ICT para los animales tratados con el Compuesto A frente a los de control no fueron significativas ($p > 0,05$). El crecimiento tumoral medio en los grupos tratados con el Compuesto A se redujo en relación con el de los animales de control, como se muestra en la FIG. 15. El compuesto A pareció tolerarse aceptablemente mostrando cambios de peso corporal medio que no diferían sustancialmente de los del control del vehículo, como se muestra en la FIG. 16. Se produjeron pérdidas progresivas de peso corporal medio en todos los grupos, incluido el grupo de control tratado con vehículo, comenzando alrededor del día 49, lo que sugiere que la pérdida de peso corporal puede estar relacionada con la carga tumoral. Un animal que recibió 1,5 mg/kg del Compuesto A alcanzó el criterio de valoración del volumen tumoral ($\geq 3000 \text{ mm}^3$) el día 53 pero no se sacrificó hasta el día 57. Como resultado, las mediciones del día 56 fueron objeto de censura estadística con respecto a los análisis de crecimiento tumoral medio y peso corporal medio.

Tabla 17. Resumen de respuesta para ED288-U1604-GA0087 el día 53

Grupo	n	Régimen de tratamiento			Volumen tumoral medio (mm ³)					Significado estadístico
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta	Día 0	Día 53	Dif	% de ICT	
1 ^{a)}	7	Vehículo	-	PO ^{b)}	UVD ^{c)} × 53	125,6	1364,9	1239,3	~	~
2	8	Compuesto A	1,5	PO	UVD × 53	128,9	706,4	956,7	53	p = 0,4080
3	8	Compuesto A	5	PO	UVD × 53	127,6	673,2	863,3	56	p = 0,3070

^{a)} el grupo de control recibió una dosis de 10 ml/kg de vehículo solo y el Compuesto A recibió una dosis de 10 ml/kg como equivalentes de base libre en mg/kg;

^{b)} dosificación oral (PO); ^{c)} dosificación una vez al día (UVD)

El Compuesto A oral administrado diariamente fue eficaz en el modelo LU2527 PDX de cáncer de pulmón. La respuesta era dependiente de la dosis y produjo ICT del 51 % con 1,5 mg/kg y del 84 % con 5 mg/kg. La diferencia en los volúmenes tumorales netos medios el día del análisis de la ICT para los animales tratados con 5 mg/kg de Compuesto A frente al de los animales de control fue significativa y el crecimiento tumoral medio se redujo considerablemente en relación con el de los animales de control.

El Compuesto A oral administrado diariamente fue modestamente eficaz en el modelo GA0087 PDX de cáncer gástrico. La respuesta produjo una ICT del 53 % con 1,5 mg/kg y del 56 % con 5 mg/kg y las diferencias en los volúmenes tumorales netos medios el día del análisis de la ICT para los animales tratados frente a los de control no fueron significativas. El crecimiento tumoral medio de los animales tratados se redujo moderadamente en relación con el de los animales de control.

El compuesto A pareció tolerarse aceptablemente en ambos estudios. Todos los grupos mostraron pérdidas medias de peso corporal progresivas tardías, lo que implica que la pérdida de peso corporal no estaba relacionada con el tratamiento.

Ejemplo 14: Eficacia *in vitro* e *in vivo* del Compuesto A en dos modelos humanos de carcinoma de células de Merkel, MKL-1 y MS-1

El carcinoma humano de células de Merkel se clasifica como un tumor neuroendocrino cutáneo agresivo que expresa LSD1. Estos tumores son más accesibles que los tumores de CPM y pueden resultar útiles en trabajos de farmacodinámica en estudios realizados en seres humanos. El tratamiento eficaz del hMCC es una necesidad altamente insatisfecha que podría ofrecer una indicación adicional para el Compuesto A. En el presente estudio preclínico que no sigue las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), se realizaron ensayos *in vitro* de inhibición de la proliferación celular para determinar los valores de CI_{50} para líneas celulares MKL-1 y MS-1 cultivadas tratadas con el Compuesto A. Además, se evaluó el compuesto A *in vivo* con respecto a la eficacia y tolerabilidad como monoterapia en dos modelos de xenoinjerto de hMCC, MKL-1 y MS-1, establecidos en ratones hembra NSG.

El propósito de este estudio fue determinar los valores de CI_{50} para células MKL-1 y MS-1 cultivadas tratadas con el Compuesto A usando ensayos *in vitro* de inhibición de la proliferación celular y determinar la eficacia y tolerabilidad *in vivo* del Compuesto A, dosificado por vía oral como monoterapia a 5 mg/kg siguiendo una pauta intermitente, en modelos de xenoinjerto MKL-1 y MS-1 establecidos en ratones hembra NSG.

En este estudio se utilizaron ratones hembra NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones de prueba tenían entre 7 y 9 semanas de vida el día de la implantación del tumor. Los animales se aclimataron durante una semana antes de la implantación del tumor.

Los animales bebían agua a voluntad (ósmosis inversa, acidificada) y tomaban una dieta para roedores PicoLab® compuesta por 20 % de proteína bruta, 5,6 % de grasa (hidrólisis ácida) y 4,7 % de fibra cruda. Los ratones se alojaron en una instalación de barrera en ALPHA-dri® con un ciclo de luz de 12 horas a $72 \pm 2^\circ\text{F}$ y con 30-70 % de humedad.

Celgene Quanticel Research (CQR) cumplió específicamente con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Academia Nacional de Ciencias) con respecto a los procedimientos de restricción, cría, quirúrgicos, la regulación de la alimentación y los líquidos y los cuidados veterinarios. El programa de cuidado y uso de animales en CQR se ajusta a las normas reguladoras pertinentes aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Celgene Quanticel Research, que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se cultivaron células MKL-1 hMCC *in vitro* en medio de cultivo RPMI-1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) que contenía 100 unidades/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (cRPMI) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Se cultivaron células MS-1 hMCC *in vitro* en cRPMI complementado con FBS al 20 %. Ambas líneas celulares se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C , en una atmósfera de dióxido de carbono al 5 % y aire al 95 %.

Para los estudios de inhibición de proliferación celular *in vitro*, se prepararon soluciones madre del compuesto A en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyeron en serie en medio de cultivo. Para los estudios de xenoinjerto *in vivo*, el compuesto A se suspendió en metilcelulosa al 0,5 % en agua a un volumen de dosificación de 10 ml/kg y se administró.

Se sembraron células hMCC MKL-1 y MS-1 en placas multipocillo que contenían medio de crecimiento en un formato de ensayo bidimensional (2D). Después, las células se trataron con el Compuesto A durante un número predeterminado de días. Se cuantificó la viabilidad celular de cada línea celular y se calcularon los valores de CI_{50} .

Ratones hembra NSG portadoras de tumores hMCC MKL-1 y MS-1 palpables (volúmenes tumorales medios respectivos de ~63 y ~45 mm³) se asignaron al azar en dos grupos cada uno. A un grupo se le administró por vía oral 5 mg/kg del Compuesto A como monoterapia siguiendo una pauta intermitente (cinco días con dosificación seguidos de dos días sin dosificación [5 con/2 sin tratamiento]) y al otro se le administró vehículo por vía oral como control.

siguiendo la misma pauta.

La eficacia se determinó basándose en la evaluación estadística de las diferencias en ICT y en el crecimiento tumoral medio de los animales tratados frente al de los de control. La tolerabilidad se evaluó controlando el estado de salud de cada animal.

La viabilidad de las líneas celulares MKL-1 y MS-1 se evaluó utilizando un formato de ensayo 2D realizado en una placa multipocillo de 96 pocillos con paredes de color negro. Cada pocillo de prueba recibió 5000 células MKL-1 suspendidas en 100 µl de RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % o 7500 células MS-1 suspendidas en 100 µl de RPMI 1640 complementado con FBS al 20 %. El compuesto A se diluyó en serie en DMSO y después se diluyó en RPMI 1640 (1:1000) para preparar una serie de soluciones madre de 50x. Cada pocillo de prueba recibió 2 µl de una de las soluciones madre o 2 µl de DMSO en RPMI 1640, como control negativo, para dar concentraciones finales del Compuesto A a 0,0, 0,7, 2,1, 6,2, 18,5, 55,5, 166,7 y 500 nM. Se realizaron de cuatro a seis copias en cada concentración. Se incubaron placas multipocillo durante 7 días y se evaluó el número de células viables en cada pocillo de prueba utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] de acuerdo con las instrucciones del fabricante y lectura con un luminómetro (FilterMax F3, Molecular Devices). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] midió el número de células viables basándose en la cuantificación de ATP.

El día de la inoculación de células tumorales, se recogieron células MKL-1 y MS-1 durante el crecimiento en fase logarítmica y se resuspendieron en Matrigel[®] al 100 % (BD Biociences, San José, CA) a una concentración de 2×10^8 células/ml. Cada ratón de prueba recibió 0,1 ml de suspensión celular (2×10^7 células) implantadas por vía subcutánea en el costado derecho. Se permitió que los tumores MKL-1 y MS-1 crecieran durante 14 días hasta que alcanzaron volúmenes tumorales medios respectivos de ~63 mm³ y ~45 mm³. Después, los ratones portadores de tumores MKL-1 se aleatorizaron en dos grupos de ocho ratones cada uno con volúmenes tumorales medios de $63,0 \pm 12,4$ mm³ y $62,9 \pm 12,4$ mm³. Los ratones portadores de tumores MS-1 se aleatorizaron en dos grupos de ocho ratones con volúmenes tumorales medios de $43,4 \pm 9,7$ mm³ y $48,1 \pm 15,9$ mm³. El día de aleatorización se denominó Día -3 y la dosificación se inició el Día 1 según el régimen predeterminado que se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Plan de tratamiento para MKL-1 o MS-1

Grupo	n	Régimen de tratamiento			
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta
1	8	Vehículo	---	PO	5 con/2 sin tratamiento
2	8	Compuesto A	5	PO	5 con/2 sin tratamiento

n = número de animales; PO = dosificación oral; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación; --- = sin administración del artículo de prueba. Se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de los animales individuales y el Compuesto A se dosificó como equivalentes de base libre en mg/kg.

Como se muestra en la Tabla 18, los ratones de control recibieron vehículo acuoso de metilcelulosa al 0,5 % administrado por vía oral (PO) siguiendo una pauta de 5 con/2 sin, repetida hasta el final del estudio. Un grupo de monoterapia con Compuesto A recibió 5 mg/kg de Compuesto A, PO, siguiendo una pauta de 5 con/2 sin. El artículo de prueba, el Compuesto A, se preparó diariamente como la sal de bencenosulfonato (74 % de compuesto activo) suspendida en un vehículo y dosificada como mg/kg de equivalentes de base libre. En todos los grupos, se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de cada animal.

Los tumores individuales se midieron dos veces por semana en tres dimensiones usando un calibrador y se calcularon los volúmenes tumorales (VT) en mm³ usando la fórmula: $VT = 0,5 \times l \times a \times h$, donde l, a y h son la longitud, la anchura y la altura en milímetros, respectivamente. El criterio de valoración del volumen tumoral para estos estudios fue de 2000 mm³. Al mismo tiempo, se pesó a los animales y se controló su estado de salud para detectar la pérdida de peso corporal y los signos de letargo mediante una exploración física.

Cuando un animal salía del estudio habiendo alcanzado el criterio de valoración del volumen tumoral, el volumen tumoral final registrado para el animal se incluía con los datos utilizados para calcular el volumen medio en los puntos temporales posteriores. Se trazaron curvas de crecimiento tumoral que mostraban los volúmenes tumorales medios del grupo (\pm error estándar de la media [EEM]) en función del tiempo y los pesos corporales medios se representaron como el cambio porcentual desde el día 1.

Utilizando las lecturas respectivas en cada pocillo de prueba, el número de células viables se normalizó con respecto al número medio de células viables en los pocillos tratados con DMSO y se expresó como porcentaje. El porcentaje de células viables se representó frente a la concentración correspondiente del Compuesto A y el valor de CI_{50} se determinó a partir de una curva de regresión no lineal logística de cuatro parámetros (4PL) generada por el complemento del programa IDBS XLfit para Microsoft Excel utilizando la ecuación 251 (ID Business Solutions Ltd., RU). El valor de CI_{50} se calculó como la concentración en la que la inhibición era la mitad de la máxima. Los ensayos

de inhibición de cada línea celular se realizaron como de cuatro a seis copias biológicas y se registró la $CI_{50} \pm$ desviación estándar (DE).

En los estudios de MKL-1 y MS-1, los respectivos análisis de ICT se realizaron el día 15 y el día 36, el primer día uno o más animales de control alcanzaron el criterio de valoración. El porcentaje de ICT se calculó utilizando la mediana de los volúmenes tumorales según la siguiente fórmula:

$$ICT_x [\%] = \left(1 - \frac{T_x - T_0}{C_x - C_0}\right) \times 100$$

donde T_0 y C_0 son los volúmenes tumorales medios respectivos de los grupos tratados y de control antes del inicio de la dosificación (día -3) y T_x y C_x son los volúmenes tumorales medios correspondientes del día "x", el día del análisis de la ICT.

Los volúmenes tumorales individuales el día del análisis de la ICT se corrigieron según sus volúmenes antes del inicio de la dosificación, y los volúmenes tumorales netos resultantes de cada grupo se representaron gráficamente en un diagrama de caja y bigotes. Las diferencias en las distribuciones del volumen tumoral neto de los animales tratados frente a los de control se evaluaron estadísticamente mediante una prueba de la t. La probabilidad calculada ($p \leq 0,05$) se consideró estadísticamente significativa. La prueba de la t es una prueba de significación estadística y no proporciona una estimación del tamaño de la diferencia entre grupos ni una medida de significación clínica o biológica.

Los valores de CI_{50} determinados experimentalmente en los ensayos de inhibición de proliferación celular 2D se resumen en la Tabla 19. Los valores de CI_{50} de las líneas celulares hMCC MKL-1 y MS-1 se midieron en el intervalo de concentración de Compuesto A de 0,0 a 500 nM y se determinaron a partir de las curvas de titulación resultantes usando regresión no lineal de 4 parámetros (4PL). Los ensayos incluyeron un control negativo de DMSO que estableció el valor inicial para una proliferación celular del 100 %. Como se muestra en la Tabla 18 y en la Figura 17, el Compuesto A produjo valores respectivos de $CI_{50} \pm DE$ de $18,4 \pm 4,8$ nM y $19,7 \pm 0,7$ nM para las líneas celulares cultivadas MKL 1 y MS-1 ensayadas en el formato 2D.

Tabla 19. Inhibición media máxima de proliferación de células hMCC.

Línea Celular	CI_{50} (nM)	DE	[n]
MKL-1	18,4	4,8	6
MS-1	19,7	0,7	4

CI_{50} = concentración inhibidora semimáxima; [n] = número de copias biológicas; DE = desviación estándar

Los animales de prueba en este estudio se trataron de acuerdo con el protocolo de la Tabla 18 y los análisis de ICT para los estudios MKL-1 y MS-1 se realizaron el día 15 y el día 36, respectivamente, el primer día uno o más animales de control alcanzaron el criterio de valoración.

Como se muestra en la Tabla 20, la monoterapia con el compuesto A fue eficaz *in vivo* en el modelo MKL-1 hMCC, lo que dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral del 52 % el día 15. Como se muestra en la figura 18, la diferencia en los volúmenes tumorales netos medios el día 15 de los animales tratados frente a los de control con vehículo fue significativa ($p=0,0002$). El crecimiento tumoral medio avanzó de manera constante en el grupo de control, como se observa en la figura 19. En el grupo de monoterapia con compuesto A, la progresión media del tumor fue algo más lenta en comparación con la observada en el control. Como se muestra en la figura 20, los grupos que recibieron monoterapia con vehículo o Compuesto A mostraron aumentos de peso corporal medio progresivos hasta el día 15 del estudio, después del cual ambos grupos mostraron una disminución similar en el aumento de peso corporal neto.

Tabla 20. Resumen de respuesta de ICT para MKL-1

Grupo	n	Régimen de tratamiento	Volumen tumoral medio (mm ³)				Significación estadística (p)
			Día 3	Día 15	Dif	% de ICT	
1	7	Vehículo	65	1767	170 2	--	--
2	8	5 mg/kg de Compuesto A siguiendo una pauta de 5 con/2 sin	65	880	815	52 %	0,0002

ICT = inhibición del crecimiento tumoral; Dif = diferencia; n = número de animales; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación; -- = no aplicable. Se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de animales individuales y el Compuesto A se dosificó como equivalentes de base libre en mg/kg; el valor de p se calcula mediante una prueba de la t.

Como se muestra en la Tabla 21, la monoterapia con el compuesto A fue eficaz *in vivo* en el modelo MS-1 hMCC, lo

que dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral del 95 % el día 36. Como se muestra en la figura 21, la diferencia en los volúmenes tumorales netos medios el día 36 para los animales tratados frente a los de control con vehículo fue significativa ($p < 0,0001$). El crecimiento tumoral medio avanzó rápidamente en el grupo de control, como se observa en la figura 6. En el grupo de monoterapia con compuesto A, la progresión media del tumor fue casi estática hasta el día 18 y después aumentó gradualmente. Tres tumores tratados con el Compuesto A experimentaron inicialmente regresión y dos se recuperaron el día 25, como se ilustra en el recuadro de la figura 22. Como se muestra en la figura 23, los grupos que recibieron monoterapia con vehículo o Compuesto A mostraron aumentos de peso corporal medio a lo largo del estudio.

Tabla 21. Resumen de respuesta de ICT para MS-1

Grupo	n	Régimen de tratamiento	Volumen tumoral medio (mm ³)				Significación estadística (p)
			Día 3	Día 36	Dif	% de ICT	
1	7	Vehículo	44	1723	1679	-	-
2	8	5 mg/kg de Compuesto A siguiendo una pauta de 5 con/2 sin	49	129	80	95 %	<0,0001

ICT = inhibición del crecimiento tumoral; Dif = diferencia; n = número de animales; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación; – = no aplicable. Se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de animales individuales y el Compuesto A se dosificó como equivalentes de base libre en mg/kg; el valor de p se calcula mediante una prueba de la t .

En los ensayos de inhibición de proliferación celular realizados *in vitro*, el Compuesto A demostró una fuerte actividad en las líneas celulares MKL-1 y MS-1 cultivadas, dando valores respectivos de $CI_{50} \pm DE$ de $18,4 \pm 4,8$ nM y $19,7 \pm 0,7$ nM.

La monoterapia con el compuesto A fue eficaz *in vivo* en el modelo MKL-1 hMCC, lo que dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral del 52 % y una diferencia significativa en los volúmenes tumorales netos medios el día 15 para los animales tratados frente a los de control con vehículo ($p = 0,0002$). En el grupo de monoterapia con compuesto A, la progresión media del tumor fue algo más lenta en comparación con la observada en el control.

La monoterapia con el compuesto A fue eficaz *in vivo* en el modelo MS-1 hMCC, lo que dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral del 95 % y una diferencia significativa en los volúmenes tumorales netos medios el día 36 para los animales tratados frente a los animales de control con vehículo ($p < 0,0001$). En el grupo de monoterapia con compuesto A, la progresión media del tumor fue casi estática hasta el día 18 y después aumentó gradualmente.

Los grupos que recibieron vehículo o monoterapia con Compuesto A mostraron aumentos medios de peso corporal a lo largo de estos estudios. El compuesto A se consideró aceptablemente tolerado en los estudios de xenoinjerto MKL-1 y MS-1.

Ejemplo 15. Efecto *in vitro* e *in vivo* del Compuesto A sobre los biomarcadores farmacodinámicos en carcinoma de células de Merkel

El carcinoma humano de células de Merkel se clasifica como un tumor neuroendocrino cutáneo agresivo que expresa LSD1. Estos tumores son más accesibles que los tumores de CPM y pueden resultar útiles en trabajos de FD en estudios realizados en humanos. El tratamiento eficaz del hMCC es una necesidad altamente insatisfecha que podría ofrecer una indicación adicional para el Compuesto A.

En el presente estudio preclínico que no sigue las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), se evaluó la modulación de la expresión del ARNm humano, después de la inhibición de LSD1 por el compuesto A, en dos modelos hMCC, MKL-1 y MS-1 *in vitro* como cultivos celulares e *in vivo* como xenoinjertos utilizando sec de ARN y qRT-PCR. Adicionalmente, se investigó la unión directa de LSD1 a los locus de los genes ST18 y FREM2 y los cambios en el estado de H3K4me2 tras el tratamiento con el Compuesto A en las líneas celulares MKL-1 y MS-1 utilizando ChIP-seq.

El propósito de este estudio era determinar el efecto de la inhibición del LSD1 mediada por el compuesto A sobre la expresión génica *in vitro* e *in vivo* en las líneas celulares de hMCC humano, MKL-1 y MS-1. De manera adicional, se investigó la unión directa de LSD1 a los locus de los genes ST18 y FREM2 y los cambios en el estado de H3K4me2 tras el tratamiento con el Compuesto A en las líneas celulares MKL-1 y MS-1 utilizando ChIP-seq.

Para estudios de cultivo celular *in vitro*, se prepararon soluciones madre del Compuesto A en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyeron en serie en medio de cultivo. Para los estudios de xenoinjerto *in vivo*, el Compuesto A se suspendió en metilcelulosa al 0,5 % en agua y se administró a un volumen de dosificación de 10 ml/kg.

Se cultivaron células MKL-1 hMCC *in vitro* en medio de cultivo RPMI-1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) que

contenía 100 unidades/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (cRPMI) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Se cultivaron células MS-1 hMCC *in vitro* en cRPMI complementado con FBS al 20 %. Ambas líneas celulares se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de dióxido de carbono al 5 % y aire al 95 %.

La modulación de la expresión génica por el Compuesto A para un panel de genes humanos se determinó cultivando células MKL-1 o MS-1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante tres días en presencia del Compuesto A 0, 10 o 100 nM y extrayendo el ARN total para su evaluación mediante sec de ARN. Se evaluaron más a fondo los genes que estaban regulados negativamente o positivamente en ambas líneas de hMCC en ambas concentraciones. A continuación, los genes que mostraron cambios en la expresión génica dependientes de la dosis de al menos dos veces en ambas líneas de hMCC en ambas concentraciones, se identificaron como genes candidatos a biomarcadores FD (farmacodinámicos).

A continuación, los genes candidatos a biomarcadores FD se evaluaron más a fondo en estudios de seguimiento. En un estudio *in vitro*, los valores de CE₅₀ para la modulación de la expresión génica con el Compuesto A se determinaron para los genes candidatos a biomarcadores FD en líneas celulares MKL-1 o MS-1 cultivadas utilizando qRT-PCR. En un estudio de respuesta a la dosis de xenoinjerto *in vivo*, a ratones hembra gamma (NSG) diabéticos no obesos con inmunodeficiencia combinada grave (NOD-SCID, *Non-obese diabetic, severe-combine immunodeficiency*) portadores de tumores palpables MKL-1 o MS-1 se les administró por vía oral vehículo o monoterapia con compuesto A a 1, 2,5 o 5 mg/kg dos veces al día (DVD) durante cinco días. Cuatro horas después de recibir la última dosis, se recogieron los tumores y se extrajo el ARN total para la evaluación mediante qRT-PCR de los cambios en la expresión genética de los biomarcadores de EP candidatos. En un estudio final, los biomarcadores de EP candidatos se analizaron por ChIP-seq para determinar la ocupación de LSD1 y los cambios en el estado de H3K4me2 en presencia del compuesto A.

A partir de estos análisis, los genes que mostraron valores de CE₅₀ correlacionados con los valores de CI₅₀ para la inhibición de la proliferación celular por el Compuesto A, una fuerte correlación entre la respuesta a la dosis *in vitro* e *in vivo*, y la ocupación de LSD1 y la modulación de H3K4me2 en presencia del Compuesto A, se identificaron como posibles biomarcadores FD (farmacodinámicos) para la inhibición de LSD 1 con el Compuesto A en el modelo hMCC.

Los ensayos de sec. de ARN y qRT-PCR se realizaron por triplicado en placas de cultivo de múltiples pocillos sembradas con células MKL-1 o MS-1 suspendidas en cRPMI complementado con FBS al 10 % o al 20 %, respectivamente. El compuesto A se diluyó en DMSO y después se diluyó nuevamente en cRPMI complementado para preparar soluciones madre. Cada pocillo de prueba recibió una parte alícuota de DMSO, como control de vehículo, o de Compuesto A, para obtener concentraciones finales del Compuesto A a 0, 10 o 100 nM para el análisis de sec. de ARN o a 0, 2,5, 7,4, 22, 66 o 200 nM para el análisis de qRT-PCR. Las placas de cultivo se incubaron durante 3 días en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % y aire al 95 %. Después del período de incubación, se recogieron las células MKL-1 o MS-1 cultivadas y el ARN total se purificó utilizando el kit RNeasy Mini (QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ratones hembra NSG con tumores hMCC MKL-1 y MS-1 palpables se asignaron al azar en cuatro grupos de tres ratones cada uno. A tres grupos se les administró por vía oral el Compuesto A como monoterapia a dosis de 1, 2,5 o 5 mg/kg siguiendo una pauta de dos veces al día durante nueve dosis (DVD x4,5). Al cuarto grupo se le administró vehículo por vía oral como control siguiendo la pauta de DVD. Cuatro horas después de la última dosis, los tumores se recogieron en solución RNAlater y se conservaron congelados.

Las muestras de tumores se descongelaron y el ARN total se purificó utilizando el kit RNeasy Mini de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ácido desoxirribonucleico (ADN) residual se eliminó mediante un tratamiento con ADNasa en columna con el equipo RNase Free DNase (QIAGEN, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total se eluyó en agua sin de RNasa y se analizó mediante qRT-PCR.

El ARN total purificado (1 µg) extraído de células cultivadas MKL-1 o MS-1 tratadas y de control se convirtió en bibliotecas de secuenciación utilizando el kit KAPA Stranded mRNA-Seq de la plataforma Illumina® (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas se secuenciaron en un sistema Illumina NextSeq® 500 (Illumina, San Diego, CA) utilizando secuenciación de ARN de extremos pares de 75 bases. Las lecturas secuenciadas se mapearon en la construcción del genoma humano hg19 y la expresión diferencial se determinó mediante análisis de varianza en todas las copias en relación con el control del vehículo.

Se generó ADN complementario (c) a partir de ARN total purificado extraído de células cultivadas MKL-1 o MS-1 tratadas y de control o de muestras de tumores en una reacción de transcripción inversa utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies, Grand Island, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó una mezcla maestra de transcripción inversa 1,5x que contenía desoxirribonucleótidos, cebadores aleatorios, transcriptasa inversa, inhibidor de RNasa y tampón de transcripción inversa y se añadieron 20 µl a cada pocillo de prueba de una placa multipocillo de 96 pocillos. Después, cada pocillo de prueba recibió 10 µl de ARN total y la placa multipocillo se selló para impedir la evaporación. La transcripción inversa se realizó en un ciclador térmico T100™ (Bio-Rad, Hercules, CA) programado utilizando parámetros

optimizados proporcionados por el fabricante del kit.

Los niveles de expresión de ARNm en respuesta al tratamiento con el Compuesto A se midieron por duplicado mediante qPCR. Se realizó qPCR TaqMan® en ADNc elaborado a partir de ARN total extraído de células cultivadas MKL-1 o MS-1 tratadas y de control o de muestras de tumores utilizando conjuntos de cebadores de los genes humanos ST18, FREM2 y actina beta (ACTB), como secuencia de referencia para normalizar la lectura absoluta de los genes diana. Los niveles totales de transcripción de ARNm se normalizaron con respecto a la transcripción de referencia de ACTB. Los cambios en la expresión del ARNm se cuantificaron calculando el factor de cambio de la expresión génica después del tratamiento con el Compuesto A en relación con el control tratado con vehículo.

Los ensayos de ChIP-seq se realizaron con células MKL-1 o MS-1 cultivadas en suspensión en cRPMI complementado con FBS al 10 % o 20 %, respectivamente. El compuesto A se diluyó en DMSO y posteriormente se diluyó nuevamente en cRPMI complementado para preparar una solución madre. Cada pocillo de prueba recibió una parte alícuota de DMSO, como control de vehículo, o el Compuesto A para dar concentraciones finales del Compuesto A a 0 o 100 nM. Las placas de cultivo se incubaron durante 3 días en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de CO₂ al 5 % y aire al 95 %. Después del período de incubación, las células MKL-1 o MS-1 cultivadas se recogieron y se entrecruzaron a temperatura ambiente añadiendo a cada pocillo una décima parte del volumen de una solución reciente de formaldehído al 11 % seguido de una incubación durante 20 minutos. La reacción de entrecruzamiento se detuvo mediante la adición un volumen 1/20 de glicina 2,5 M. A continuación, las células entrecruzadas se recogieron y se aclararon dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y alícuotas que contenían 6×10^6 células MS 1 o $4,5 \times 10^6$ células MKL-1, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C.

Los sedimentos celulares congelados que contenían células fijadas con formaldehído, se sometieron a lisis y a ultrasonido para solubilizar y cortar la cromatina entrecruzada (Bioruptor®, Diagenode, Denville, NJ). La cromatina se preparó utilizando el kit iDeal ChIP-seq para factores de transcripción (Diagenode, Denville, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cromatina asociada a LSD1 se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-LSD1 (Abeam, Cambridge, MA) utilizando el kit iDeal ChIP-seq para factores de transcripción. La cromatina asociada a H3K4me2 se inmunoprecipitó con el anticuerpo policlonal H3K4me2 (Millipore, Billerica, MA) utilizando el kit iDeal ChIP-seq para histonas (Diagenode, Denville, NJ). La cromatina preparada a partir de cada muestra pero no sometida a ninguna inmunoprecipitación se utilizó como control de entrada y se procesó en paralelo a las muestras ChIPed. Cada muestra se trató para revertir el entrecruzamiento y el ADN se purificó mediante tratamiento con ARNasa A, proteinasa K y fenol: extracción con cloroformo: alcohol isoamílico seguida de precipitación con etanol. Las bibliotecas de ChIP se prepararon utilizando el kit de preparación de bibliotecas MicroPlex v2 (Diagenode, Denville, NJ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas de ChIP se seleccionaron por tamaño utilizando perlas AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) según las instrucciones del fabricante antes de realizar la secuenciación en un sistema Illumina NextSeq® 500 que utiliza longitudes de lectura de un solo extremo de 75 bases.

Las lecturas secuenciadas se mapearon en la construcción del genoma humano hg19 utilizando la herramienta informática Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (©Alexander Dobin, 2009-2016) y los recuentos de las transcripciones se normalizaron utilizando el análisis empírico de datos de expresión genética digital en R (edgeR) y el análisis diferencial de expresión genética basado en las herramientas informáticas de distribución binomial negativa (DESeq2) (©Bioconductor, 2003 - 2017). La expresión diferencial se determinó mediante análisis de varianza en todas las copias en relación con el control del vehículo.

En el análisis de expresión qPCR, el umbral del ciclo (C_t , *cycle threshold*) se define como el número de ciclos necesarios para que la señal de la PCR supere el fondo. Delta C_t (ΔC_t) corresponde al valor C_t del gen diana ST18 o FREM2 normalizado al valor C_t de la secuencia de referencia ACTB, donde

$$\Delta C_{t_{\text{diana}}} = C_{t_{\text{diana}}} - C_{t_{\text{ACTB}}}.$$

La cuantificación de la expresión diana relativa se calculó mediante el método de C_t comparativo. El método de C_t comparativo implicó calcular la diferencia entre el $\Delta C_{t_{\text{diana}}}$ de cada muestra tratada y de control y la media de $\Delta C_{t_{\text{diana}}}$ de la muestra de control como se muestra a continuación:

$$\Delta \Delta C_{t_{\text{diana}}} = \Delta C_{t_{\text{diana, tratada o control}}} - \text{media } \Delta C_{t_{\text{diana, control}}}.$$

El factor de cambio, calculado como $2^{-\Delta \Delta C_t}$, en la expresión de ARNm diana frente a la concentración del Compuesto A (en relación con el control) se calculó para cada concentración del Compuesto A analizada. A continuación, la CE_{50} se determinó a partir de una curva de regresión no lineal de 4PL ajustada a esos datos utilizando el complemento del programa IDBS XLfit para Microsoft Excel y la ecuación 251 (ID Business Solutions Ltd., RU).

Las secuencias de la biblioteca ChIP se alinearon con las de la construcción del genoma humano hg19 utilizando el programa informático de alineación de lectura corta Bowtie 2 (Langmead, 2012). Las regiones enriquecidas o "unidas" de LSD1 o H3K4me2 en células MKL-1 o MS-1 se determinaron en relación con las lecturas de fondo de la muestra de extracto de células completas. Para el análisis posterior solo se utilizaron lecturas que pasaron el filtro de calidad

de mapeo de Illumina (MAPQ) con puntuaciones de al menos 20. Las lecturas procedentes de duplicados de PCR se eliminaron utilizando la herramienta Picard MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard>, Broad Institute, Cambridge, MA). El número de lecturas por ChIP-seq se normalizó entre las muestras de control y tratadas mediante una reducción aleatoria del número de lecturas de la muestra con el número mínimo de lecturas. Los picos de ChIP se seleccionaron mediante el análisis basado en modelos de ChIP-seq (MACS) (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>; Zhang, 2008). Los rastros de cobertura del genoma se generaron utilizando la herramienta deepTools bamCoverage (<http://deeptools.readthedocs.io/en/latest/content/tools/bamCoverage.html>; Ramirez, 2016). Se utilizó el visor de genómica integrativa IGV (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>; Robinson, 2011; Thorvaldsdóttir, 2013) para visualizar los rastros de ChIP-seq.

La modulación de la expresión génica por el Compuesto A de un panel de genes humanos se determinó cultivando células MKL-1 o MS-1 durante tres días en presencia del Compuesto A 0, 10 o 100 nM y extrayendo el ARN total para su evaluación mediante sec. ARN. Como se muestra en la FIG. 24, 17 de 4303 genes regulados negativamente (Tabla 22) y 172 de 3803 genes regulados positivamente (Tabla 23) mostraron cambios en la expresión génica en ambas líneas hMCC a ambas concentraciones.

Tabla 22. Genes regulados negativamente identificados mediante sec. de ARN

	Símbolo	Descripción
1	CRYBG3	Cristalina Beta-Gamma con dominio 3
2	ADRA2B	Receptor adrenérgico alfa 2B
3	AHNAK	Nucleoproteína AHNAK
4	CD44	Molécula de CD44 (grupo sanguíneo indio)
5	CDKN1C	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1C
6	CNPY1	Regulador de señalización de FGF Canopy 1
7	FBLN7	Fibulina 7
8	KCNH5	Miembro 5 de la subfamilia H del canal de potasio dependiente de voltaje
9	MARVELD3	MARVEL con Dominio 3
10	MEGF10	Múltiples dominios similares a EGF 10
11	NID1	Nidógeno 1
12	PKHD1L1	Enfermedad policística renal y hepática 1 (autosómica recesiva)-Tipo 1
13	PLD5	Miembro de la familia 5 de la fosfolipasa D
14	RASSF6	Miembro 6 de la familia de dominio de Asociación Ras
15	SEMA3E	Semaforina 3E
16	T	Factor de transcripción T Brachyury
17	ZNF215	Proteína de dedo de cinc 215

Tabla 23. Genes regulados positivamente identificados por sec. de ARN.

	Símbolo	Descripción
1	ABLIM1	Proteína LIM de unión a actina 1
2	AC079354.1	Proteína KIAA2012 no caracterizada
3	ACVR1	Receptor de activina A Tipo 1
4	ACVR2A	Receptor de activina A Tipo 2A
5	AIM1	Ausente En Melanoma 1
6	AMER2	Proteína 2 de reclutamiento de membrana de APC
7	AMOTL2	Angiomotina de tipo 2
8	ANK3	Anquirina 3
9	ANTXR1	Receptor 1 de la toxina del carbunco
10	ARHGEF26	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho 26
11	ARPP21	Fosfoproteína 21 regulada por CAMP
12	ATOX1	Factor de transcripción atonal BHLH 8
13	AUTS2	Candidato de susceptibilidad al autismo 2
14	B3GALT5	Beta-1,3-galactosiltransferasa 5
15	BACH2	Dominio BTB y homólogo CNC 2

(continuación)

	Símbolo	Descripción
16	BASP1	Proteína 1 de señal unida a la membrana abundante en el cerebro
17	BCL11A	Célula B CLL/Linfoma 11A
18	BICD1	Adaptador de carga BICD 1
19	BRINP2	BMP/neuroespecífica inducible por ácido retinoico 2
20	C11orf87	Marco abierto de lectura 87 del cromosoma 11
21	CA10	Anhidrasa carbónica 10
22	CACNA2D1	Subunidad auxiliar alfa2delta1 del canal de calcio dependiente del voltaje
23	CADM1	Molécula de adhesión celular 1
24	CADPS	Activador de secreción dependiente de calcio
25	CAMK4	Proteína cinasa IV dependiente de calcio/calmodulina
26	CAMSAP2	Miembro 2 de la familia de proteínas asociadas a espectrina regulada por calmodulina
27	CBLB	Protooncogén B Cbl
28	CDC14B	Ciclo de división celular 14B
29	CDC42EP3	Proteína 3 efectora CDC42
30	CDH10	Cadherina 10
31	CDH11	Cadherina 11
32	CDDHI	Miembro de la familia relacionado con Cadherina 1
33	CLIP3	Proteína enlazadora 3 que contiene el dominio CAP-Gly
34	CLVS1	Clavesina 1
35	CMIP	Proteína inductora de C-Maf
36	CNN3	Calponina 3
37	COL1A2	Cadena Alfa 2 de Colágeno Tipo I
38	CRB1	Componente del complejo de polaridad celular de Crumbs 1
39	CREB5	Proteína 5 de unión al elemento sensible AMPc
40	CRISPLD2	Proteína secretora rica en cisteína que contiene el dominio 2 de LCCL
41	CTTNBP2NL	CTTNBP2 tipo N-terminal
42	CYP27C1	Miembro 1 de la subfamilia C de la de la familia 27 del Citocromo P450
43	DCN	Decorina
44	DCX	Doblecortina
45	DFNA5	DFNAS, Supresor de tumor asociado a sordera
46	DISP1	Miembro 1 de la familia de transportadores Dispatched RND
47	DLL1	Ligando 1 Notch canónico de tipo Delta
48	DNAJB5	Miembro B5 de la familia de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40)
49	DYNC111	Cadena Intermedia 1 de Dineína Citoplasmática 1
50	EBF2	Factor temprano 2 de células B

Tras una evaluación adicional, dos genes regulados positivamente, ST18 y FREM2, que mostraban cambios dependientes de la dosis en la expresión génica de al menos 2 veces en ambas líneas hMCC a ambas concentraciones, se identificaron como genes candidatos a biomarcadores FD, tal como se muestra en la Tabla 24. Se ha demostrado que ST18 actúa como supresor tumoral en el cáncer de mama (Jandrig, 2004) y que regula la expresión de genes proapoptóticos y proinflamatorios en los fibroblastos (Yang, 2008). En pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, se producen metástasis distales con frecuencia. Un estudio reciente demostró que FREM2 regulaba la migración y la invasión en lugar de la proliferación de la línea celular A549 de cáncer de pulmón no microcítico mediante la regulación negativa de la señalización de la cinasa de adhesión focal (Zhan, 2014).

Tabla 24. Genes candidatos a biomarcadores farmacodinámicos

	Gen	Descripción
Reg. Pos.	ST18ST18, Dedo de Cinc de Tipo C2H2C	
	FREM2	Proteína 2 de la matriz extracelular relacionada con FRAS1
Reg. Pos. = regulación positiva		

Como se muestra en la Figura 25, los valores de CE_{50} de la modulación de la expresión génica con el Compuesto A se determinaron mediante qRT-PCR para determinar los genes candidatos a biomarcadores FD en líneas celulares MKL-1 o MS-1 cultivadas durante tres días en presencia de Compuesto A a 0, 2,5, 7,4, 22, 66 o 200 nM. ST18 y FREM2 mostraron valores de CE_{50} que se correlacionaban con los valores de CI_{50} para la inhibición con el Compuesto A de la proliferación celular en estas líneas celulares (< 20 nM, datos no mostrados).

En el estudio de respuesta a la dosis de xenoinjerto *in vivo*, grupos de tres ratones hembra NSG portadores de tumores recibieron por vía oral (PO) vehículo o compuesto A a una dosis de 1, 2,5 o 5 mg/kg DVD x4,5. Cuatro horas después de recibir la última dosis, se recogieron los tumores y se extrajo el ARN total para la evaluación mediante qRT-PCR de los cambios en la expresión genética de los biomarcadores de EP candidatos. Como se muestra en la Figura 25, ST18 y FREM2 mostraron un factor de cambio ≥ 2 en la expresión génica y presentaron una respuesta dependiente de la dosis *in vivo* en ambos modelos.

Como se muestra en la Figura 26, el análisis ChIP-seq demostró la unión de LSD1 en los genes ST18 y FREM2 en células MKL-1 y MS-1 cultivadas. En consonancia con una modulación dependiente de LSD1 de la metilación de H3K4 en el gen ST18, el tratamiento con el compuesto A condujo a un aumento de H3K4me2 en el sitio de unión de LSD1 en los dos modelos MKL 1 y MS-1. Adicionalmente, el tratamiento con el compuesto A condujo a un aumento de H3K4me2 en el sitio de unión de LSD1 en el gen FREM2 en el modelo MKL-1, pero no en el modelo MS-1. Estos resultados van en consonancia con ST18, y posiblemente FREM2, como genes diana directos de LSD1, confirmando los como posibles biomarcadores FD para la inhibición de LSD1 con el compuesto A en hMCC.

Se evaluó la modulación de la expresión del ARNm después de la inhibición de LSD1 por el compuesto A en un panel de genes en dos modelos de hMCC, MKL-1 y MS-1. Se seleccionaron dos genes, ST18 y FREM2, para una evaluación adicional del efecto de la inhibición mediada por el compuesto A de LSD1 sobre la expresión génica *in vitro* e *in vivo* y para determinar la unión directa de LSD1 y la modulación dependiente de LSD1 de la metilación de H3K4 en sus locus génicos en los modelos MKL 1 y MS-1.

La modulación de la expresión génica por el Compuesto A en un panel de genes humanos evaluados por sec. de ARN en células MKL-1 o MS-1 cultivadas descubrió que 17 de 4303 genes regulados negativamente y 172 de 3803 genes regulados positivamente mostraban cambios de expresión en ambas líneas hMCC a ambas concentraciones. Tras una evaluación adicional, dos genes regulados positivamente, ST18 y FREM2, que mostraban cambios dependientes de la dosis en la expresión génica de al menos 2 veces, se identificaron como genes candidatos a biomarcadores FD.

Los valores de CE_{50} para la modulación con el Compuesto A de la expresión de los genes ST18 y FREM2, se determinaron en líneas celulares MKL-1 o MS-1 cultivadas utilizando qRT-PCR. Ambos genes presentaron valores de CE_{50} que se correlacionaban con los valores de CI_{50} para la inhibición de la proliferación celular en estas líneas celulares con el Compuesto A (< 20 nM, datos no mostrados).

En un estudio de respuesta a la dosis de xenoinjerto *in vivo*, los genes ST18 y FREM2 mostraron un factor cambio ≥ 2 en la expresión y presentaron una respuesta dependiente de la dosis en ambos modelos de hMCC.

El análisis ChIP-seq demostró la unión de LSD1 en los locus de los genes ST18 y FREM2 en células MKL 1 y MS-1 cultivadas. En consonancia con una modulación dependiente de LSD1 de la metilación de H3K4 en el locus del gen ST18, el tratamiento con el Compuesto A condujo a un aumento de H3K4me2 en el sitio de unión de LSD1 en ambos modelos. Adicionalmente, el tratamiento con el Compuesto A conduce a un aumento de H3K4me2 en el sitio de unión de LSD1 del gen FREM2 en el modelo MKL-1, pero no en el modelo MS-1. Estos resultados van en consonancia con ST18, y posiblemente FREM2, como genes diana directos de LSD1, confirmando los como posibles biomarcadores FD para la inhibición de LSD 1 con el compuesto A en hMCC.

Ejemplo 16. La eficacia *in vivo* del Compuesto A solo y junto con etopósido en el modelo de xenoinjerto subcutáneo LXFS 573 procedente de pacientes con cáncer de pulmón microcítico, en ratones hembra lampiños

La eficacia y tolerabilidad *in vivo* del Compuesto A solo y junto con etopósido se evaluaron preclínicamente utilizando el modelo de xenoinjerto subcutáneo LXFS 573 procedente de pacientes (PDX) con cáncer de pulmón microcítico (CPM), establecido en ratones Foxn1nu hembra inmunodeficientes. La eficacia se determinó basándose en las diferencias en el retraso del crecimiento tumoral (RCT), la supervivencia del estudio y el crecimiento medio del tumor de los animales tratados frente a la de los animales de control a lo largo del estudio. La tolerabilidad se evaluó basándose en las diferencias del peso corporal medio entre los animales tratados y los de control.

Se obtuvieron fragmentos de tumor LXFS 573 de xenoinjertos realizados con pases en serie en ratones desnudos. Después de extraerlos de los ratones donantes, los tumores se cortaron en fragmentos (de 3 a 4 mm de longitud de borde) y se colocaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía una solución de penicilina y estreptomycin al 10 %. Ratones hembra Foxn1nu inmunodeficientes receptores se anestesiaron con inhalación de isoflurano y recibieron implantes tumorales unilaterales por vía subcutánea en el costado. Se permitió que los tumores crecieran durante 35 días hasta que alcanzaron ~ 132 mm³. Después, los ratones portadores de tumores se aleatorizaron en seis grupos de ocho ratones con volúmenes tumorales medios de $134,3 \pm 68,2$ mm³, $130,7 \pm 68,9$

mm³, 132,4 ± 66,3 mm³, 133,1 ± 64,9 mm³, 132,1 ± 62,6 mm³ y 132,4 ± 63,2 mm³. Este día se denominó Día 0 y la dosificación se inició según el régimen predeterminado que se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Plan de tratamiento

Grupo	N	Régimen de tratamiento			
		Agente	Dosis (mg/kg/día)	Vía	Pauta (días)
1	8	Vehículo	-	PO	1-133
2	8	Compuesto A	5	PO	1-133
3	8	Etopósido	24	SC	1-3
		Vehículo	-	PO	4-133
4	8	Etopósido	24	SC	1-3
		Compuesto A	1	PO	4-133
5	8	Etopósido	24	SC	1-3
		Compuesto A	2,5	PO	4-133
6	8	Etopósido	24	SC	1-3
		Compuesto A	5	PO	4-133

Vehículo dosificado a 10 ml/kg y Compuesto A dosificado como equivalentes de base libre en mg/kg;
PO = dosificación oral; SC = dosificación subcutánea.

Los tumores individuales se midieron dos veces a la semana en dos dimensiones usando un calibrador y se calcularon los volúmenes de los tumores (VT) en mm³ usando la fórmula: $VT = 0,5 a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto en milímetros, respectivamente. Las curvas de crecimiento tumoral representaron los volúmenes tumorales medios del grupo (± error estándar de la media [EEM]) en función del tiempo. Las pruebas t múltiples, corregidas para el número de comparaciones, evaluaron la significación de la diferencia en los volúmenes tumorales medios en cada punto temporal para 5 mg/kg de Compuesto A administrado como monoterapia o junto con etopósido. Cuando un animal salió del estudio habiendo alcanzado el criterio de valoración del volumen del tumor (2000 mm³) o se sacrificó por estar moribundo, el volumen tumoral final registrado para el animal se incluía con los datos utilizados para calcular el volumen medio en los puntos temporales posteriores. Los animales se pesaron dos veces por semana y se construyeron gráficas de peso corporal medio como cambio porcentual desde el día 0. Ambas representaciones gráficas se interrumpieron cuando más del 50 % de los animales evaluables de un grupo salía del estudio. Un régimen se consideró aceptablemente tolerado si la pérdida de peso corporal medio fue inferior al 20 % durante la prueba y no más de un animal salía del estudio por causas relacionadas con el tratamiento.

Cada animal de prueba se sacrificaba cuando su tumor alcanzaba el criterio de valoración de volumen de 2000 mm³ o el último día del estudio (día 133), lo que ocurriera primero. El tiempo hasta el criterio de valoración (TTE, *time-to-endpoint*) de cada ratón se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$TTE \text{ (días)} = \frac{\log_{10}(2000 \text{ mm}^3) - b}{m}$$

donde b es la intersección y m es la pendiente de la línea obtenida por regresión lineal de un volumen tumoral transformado a log₁₀ compuesto por la primera observación que superó los 2000 mm³ y las tres mediciones anteriores. A los animales que no alcanzaron el criterio de valoración se les asignó un valor de TTE igual al del último día del estudio. A los animales sacrificados por estar moribundos se les asignó un valor de TTE igual al del día del sacrificio.

El resultado del tratamiento se evaluó a partir del retraso del crecimiento tumoral (RCT), definido como el cambio en la mediana del TTE en un grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control con vehículo:

$$RCT = T - C,$$

expresado en días, o como porcentaje de la mediana del TTE del grupo de control con vehículo:

$$\% \text{ de RCT} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

donde:

T = mediana del TTE para un grupo de tratamiento, y
C = mediana del TTE para el grupo de control con vehículo.

La eficacia del tratamiento también se determinó a partir del SE(VTM) definido como el número de supervivientes del

estudio (SE) el día 133 que portaban tumores con un volumen tumoral medio (VTM) indicado.

Se construyeron gráficos de Kaplan-Meier que muestran el porcentaje de animales que permanecieron en el estudio a lo largo del tiempo. Se empleó la prueba de orden logarítmico (Mantel-Cox) para evaluar la significación de las diferencias en los gráficos de Kaplan-Meier entre grupos. Un valor de p calculado $\leq (0,05/\text{número de comparaciones})$ ajustado para comparaciones múltiples se consideró estadísticamente significativo. La prueba de orden logarítmico es una prueba de significación estadística y no proporciona una estimación del tamaño de la diferencia entre grupos ni una medida de significación clínica o biológica.

La Tabla 24 resume el plan de tratamiento del estudio P380E4 _R400 _LXFS 573. Los animales de prueba se clasificaron en seis grupos de ocho ratones por grupo y los tratamientos se iniciaron el día 0 cuando el tamaño promedio del tumor cumplía con los criterios de aleatorización. Los ratones de control recibieron un vehículo de metilcelulosa al 0,5 % administrado mediante sonda oral (PO) siguiendo una pauta de una vez al día, como se muestra. Los ratones tratados recibieron el Compuesto A oral o etopósido subcutáneo (SC), solo o en combinación, siguiendo las pautas mostradas de una vez al día. El artículo de prueba, el Compuesto A, se preparó diariamente como la sal de bencenosulfonato (74 % de compuesto activo) suspendida en un vehículo y dosificada como mg/kg de equivalentes de base libre. En todos los grupos, se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de los animales individuales y la pauta de dosificación continuó hasta que el animal salía del estudio. Dos animales tuvieron un descanso farmacológico, que no tuvo ningún efecto sobre los resultados.

Los animales de prueba se trataron de acuerdo con el protocolo de la Tabla 19 y el estudio finalizó el día 133. La Tabla 26 resume las respuestas del RCT y la Figura 27 muestra los gráficos de Kaplan-Meier de todos los grupos. Se empleó la prueba de orden logarítmico para evaluar la significación de las diferencias en los gráficos de Kaplan-Meier entre grupos. Un valor de p calculado $\leq 0,003 (0,05/15)$ ajustado para comparaciones múltiples se consideró estadísticamente significativo. La Figura 28 presenta curvas de crecimiento tumoral medio para los seis grupos de animales de prueba. La Figura 29 presenta los cambios porcentuales del peso corporal medio del grupo desde el día 0. Dado que ningún régimen provocó una pérdida media de peso corporal $> 20 \%$ durante la prueba y no se comunicaron muertes relacionadas con el tratamiento, todos los regímenes se consideraron como aceptablemente tolerados.

Tabla 26. Resumen de respuestas del RCT

Grupo	N	Régimen de tratamiento	Mediana de ETT (días)	T-C (Días)	% de RCT	SE(VTM)
1	8	Vehículo a 10 ml/kg/día	42	---	---	0 (na)
2	8	Compuesto A a 5 mg/kg/día	133	91	217	7 (1064)
3	8	Etopósido at 24 mg/kg/día + Vehículo	63	21	50	0 (na)
4	8	Etopósido y después Compuesto A a 1 mg/kg/día	59	16	38	1 (1430)
5	8	Etopósido y después Compuesto A a 2,5 mg/kg/día	121	79	188	3 (1121)
6	8	Etopósido y después Compuesto A a 5 mg/kg/día	133	91	217	8 (121)

En vehículo se dosificó a 10 ml/kg de metilcelulosa al 0,5 % y el Compuesto A a 10 ml/kg como equivalentes de base libre en mg/kg; N = número de animales evaluados en cada grupo; TTE = tiempo hasta el criterio de valoración; T-C = diferencia entre la mediana de TTE (días) de los grupos tratados frente al control; % de RCT = $(T-C)/C \times 100$; RCT máximo posible = 91 días (217 % de RCT); SE(VTM) = número de supervivientes del estudio (SE) portadores de tumores con un volumen tumoral medio (mm^3) (VTM), na = no aplicable.

Como se muestra en la Tabla 26 y en la Figura 27, ocho tumores de los ratones de control crecieron hasta el criterio de valoración de 2000 mm^3 entre los días 21,2 y 55,3. Como se indica en la Tabla 26, la mediana del TTE para los ratones de control fue de 42 días, estableciendo un RCT máximo posible de 91 días (217 % de RCT) para este estudio. El crecimiento tumoral medio avanzó rápidamente, como se observa en la Figura 28. Como se muestra en la Figura 29, el grupo de control con vehículo mostró un aumento de peso corporal medio del 4 % el día 45, el último día al menos la mitad de los animales permanecieron en el estudio.

Como se indica en la Tabla 26, la monoterapia con compuesto A a 5 mg/kg produjo una mediana de TTE de 133 días, correspondiente al RCT máximo posible (91 días, 217 %). Como se muestra en la Tabla 26 y en la Figura 27, un animal alcanzó el criterio de valoración el día 117 y siete animales portadores de tumores con un VTM de 1064 mm^3 sobrevivieron al estudio. Como se indica en la Figura 27, la prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con el grupo de control ($p < 0,0001$). La progresión media del tumor se retrasó notablemente en comparación con la observada en el control, como se observa en la Figura 28. El grupo de monoterapia con el compuesto A mostró una pérdida de peso corporal medio del 0,4 % al final del estudio, como se muestra en la Figura 29.

La monoterapia con etopósido a 24 mg/kg produjo una mediana de ETT de 63 días, correspondiente a un RCT de 21 días o del 50 %. Los tumores de ocho animales de prueba crecieron hasta el criterio de valoración entre 45,1 y 72,5 días. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con el grupo de control ($p = 0,0007$) y una eficacia significativamente menor en comparación con el grupo de monoterapia con Compuesto A de 5 mg/kg ($p < 0,0001$). El volumen tumoral medio disminuyó durante ~17 días antes de recuperarse a una tasa de crecimiento similar a la de los tumores en los animales de control. El grupo de monoterapia con etopósido mostró un aumento de peso corporal medio del 6,3 % el día 66, el último día la mitad de los animales permanecieron en estudio.

El compuesto A a 1, 2,5 o 5 mg/kg administrado junto con etopósido produjo medianas de TTE dependientes de la dosis de 59, 121 y 133 días, correspondientes a RCT de 16 días (38 %), 79 días (188 %) y 91 días (217 %, el máximo posible).

En el grupo que recibió 1 mg/kg de terapia combinada del Compuesto A, los tumores de siete animales de prueba crecieron hasta el criterio de valoración entre 45,3 y 79,8 días y un animal portador de un tumor con un volumen de 1430 mm³ sobrevivió al estudio. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con el grupo de control ($p = 0,0015$), ninguna diferencia en comparación con el grupo de monoterapia con etopósido ($p = 0,4408$) y una eficacia significativamente menor en comparación con el grupo de monoterapia con Compuesto A a 5 mg/kg ($p = 0,0008$). El volumen tumoral medio disminuyó durante ~17 días antes de recuperarse a una tasa de crecimiento similar a la de los tumores en los animales de control. La progresión tumoral media fue similar a la observada con la monoterapia de etopósido. El grupo con terapia combinada de 1 mg/kg del Compuesto A, mostró un aumento de peso corporal medio del 5,5 % el día 59, el último día al menos la mitad de los animales permanecieron en el estudio.

En el grupo que recibió 2,5 mg/kg de terapia combinada del Compuesto A, los tumores de cinco animales de prueba crecieron hasta el criterio de valoración entre 89,6 y 125,6 días y tres animales portadores de tumores con un VTM de 1121 mm³ sobrevivieron al estudio. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con los grupos de control y monoterapia con etopósido ($p < 0,0001$) y ninguna diferencia en la eficacia en comparación con los grupos de monoterapia con Compuesto A a 5 mg/kg ($p = 0,0351$) o de terapia combinada con compuesto A a 1 mg/kg ($p = 0,0132$). El volumen tumoral medio disminuyó durante ~17 días antes de recuperarse gradualmente hasta alcanzar una tasa de crecimiento más lenta que la observada en los tumores de los animales de control. El grupo con terapia combinada de 2,5 mg/kg del Compuesto A, mostró un aumento de peso corporal medio del 3,8 % el día 126, el último día la mitad de los animales permanecieron en estudio.

En el grupo que recibió 5 mg/kg de terapia combinada del Compuesto A, ocho animales portadores de tumores con un VTM de 121 mm³ sobrevivieron al estudio. En el día 91, un tumor experimentó regresión por debajo del límite de palpabilidad donde permaneció hasta el final del estudio. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con los grupos de control y monoterapia con etopósido ($p < 0,0001$) y la terapia combinada con 1 mg/kg de compuesto A ($p = 0,0004$) y ninguna diferencia en la eficacia en comparación con los grupos de monoterapia con 5 mg/kg de compuesto A ($p = 0,3173$) o la terapia combinada con 2,5 mg/kg de compuesto A ($p = 0,0085$). El volumen tumoral medio disminuyó durante ~17 días y después permaneció casi estático a lo largo del estudio. Múltiples pruebas t encontraron que la diferencia en los volúmenes tumorales medios en cada momento para 5 mg/kg del Compuesto A administrado como terapia combinada en comparación con la monoterapia fue significativa a partir de las mediciones del Día 7 y permaneció significativa hasta el final del estudio ($p \leq 0,01$). El grupo de terapia combinada de 5 mg/kg del Compuesto A mostró un aumento de peso corporal medio del 0,6 % al final del estudio.

La eficacia y tolerabilidad *in vivo* del Compuesto A (1, 2,5 o 5 mg/kg) solo y junto con etopósido (24 mg/kg) se evaluaron preclínicamente utilizando el modelo LXFS 573 de CPM PDX establecido en ratones hembra Foxn1nu inmunodeficientes.

La monoterapia con etopósido a 24 mg/kg produjo una mediana de ETT de 63 días, correspondiente a un RCT de 21 días o del 50 %. Los tumores de ocho animales de prueba crecieron hasta el criterio de valoración entre 45,1 y 72,5 días. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con el grupo de control ($p = 0,0007$) y una eficacia significativamente menor en comparación con el grupo de monoterapia con Compuesto A de 5 mg/kg ($p < 0,0001$).

El compuesto A oral a dosis de 1, 2,5 o 5 mg/kg administrados diariamente los días 4-133 (final del estudio) junto con 24 mg/kg de etopósido administrados diariamente los días 1-3 fue eficaz en el modelo LXFS 573 PDX de CPM. El retraso en el crecimiento tumoral dependió de la dosis, lo que produjo medianas de ETT respectivas de 59, 121 y 133 días, correspondientes a RCT de 16 días (38 %), 79 días (188 %) y 91 días (217 %, el RCT máximo posible para este estudio). La supervivencia del estudio también mostró dependencia de la dosis, lo que produjo 1, 3 y 8 supervivientes el día 133, respectivamente, y diferencias significativas en la supervivencia global en comparación con la del grupo de control ($p \leq 0,0015$). El volumen tumoral medio para el grupo de etopósido más 5 mg/kg del Compuesto A disminuyó durante ~17 días y después permaneció casi estático a lo largo del estudio con un VTM de 121 mm³ el día 133.

- La monoterapia con el Compuesto A oral a 5 mg/kg administrados diariamente los días 1-133 también provocó la respuesta máxima con una mediana de TTE de 133 días correspondiente a un RCT de 91 días o del 217 % y produjo una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con la del grupo control ($p = 0,0001$). La progresión media del tumor se retrasó notablemente con un VTM de 1064 mm³ el día 133. Las evaluaciones de las diferencias en la mediana de TTE, en el número de supervivientes del estudio, en el crecimiento tumoral medio y en el porcentaje de animales que permanecieron en el estudio a lo largo del tiempo, revelaron que las respuestas a 5 mg/kg de Compuesto A administrado solo o junto con etopósido fueron superiores a las de los restantes regímenes de tratamiento. Aunque la supervivencia global de los animales que recibieron 5 mg/kg del Compuesto A en monoterapia frente a la de la terapia combinada no fue significativamente diferente ($p = 0,9998$), los volúmenes tumorales medios los días 7-133 fueron significativamente menores para los animales de prueba que recibieron etopósido y después 5 mg/kg de Compuesto A en comparación con los que recibieron 5 mg/kg de Compuesto A solo ($p \leq 0,01$).
- Todos los regímenes de tratamiento parecieron tolerarse aceptablemente y produjeron cambios mínimos en el peso corporal medio del grupo entre el primer y el último día de medición y ninguna muerte clasificada como relacionada con el tratamiento.
- Ejemplo 17. Eficacia del compuesto A solo o junto con etopósido en el modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón microcítico NCI-H1417
- El propósito de este estudio fue determinar la eficacia y la tolerabilidad del Compuesto A, dosificado por vía oral a 5 mg/kg siguiendo una pauta intermitente de 5 con/2 sin, como monoterapia o en combinación con 24 mg/kg de etopósido en el modelo de xenoinjerto de CPM NCI-H1417 establecido en ratones hembra NSG.
- En este estudio se utilizaron ratones hembra NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Los ratones de prueba tenían 9 semanas de vida el día de la implantación del tumor. Los animales se aclimataron durante una semana antes de la implantación del tumor.
- Los animales bebían agua a voluntad (ósmosis inversa, acidificada) y tomaban una dieta para roedores PicoLab® compuesta por 20 % de proteína bruta, 5,6 % de grasa (hidrólisis ácida) y 4,7 % de fibra cruda. Los ratones se alojaron en una instalación de barrera en ALPHA-dri® con un ciclo de luz de 12 horas a 72 ± 2 °F y con 30-70 % de humedad.
- Las células NCI-H1417 se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10 % (cRPMI), 100 unidades/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de dióxido de carbono al 5 % y aire al 95 %.
- El compuesto A se formuló en metilcelulosa al 0,5 % en agua con un volumen de dosificación de 10 ml/kg.
- Se asignaron al azar ratones hembra NSG con tumores CPM NCI-H1417 palpables (volúmenes tumorales medios - 230 mm³) en cuatro grupos. A dos grupos se les administraron 5 mg/kg del Compuesto A por vía oral siguiendo una pauta intermitente de 5 con/2 sin como monoterapia o después de un tratamiento inicial de tres días con 24 mg/kg de etopósido. El estudio incluyó un grupo de monoterapia con etopósido y un grupo de control con vehículo.
- La eficacia se determinó basándose en la evaluación estadística de las diferencias en el RCT y las diferencias en los valores de TTE y el crecimiento tumoral medio para los animales tratados frente a los de control a lo largo del estudio. La tolerabilidad se evaluó controlando el peso corporal y el estado de salud de cada animal individual.
- El día de la inoculación de células tumorales, se recogieron células humanas NCI-H1417 durante el crecimiento en fase logarítmica y se resuspendieron en Matrigel® al 100 % a una concentración de $7,5 \times 10^7$ células/ml. Después, cada ratón de prueba recibió 0,1 ml de suspensión celular ($7,5 \times 10^6$ células) implantadas por vía subcutánea en el costado derecho. Se permitió que los tumores crecieran durante 43 días hasta que alcanzaron ~230 mm³. Después, los ratones portadores de tumores se aleatorizaron en cuatro grupos de siete ratones con volúmenes tumorales medios de $241,7 \pm 29,4$ mm³, $220,4 \pm 33,2$ mm³, $222,7 \pm 35,9$ mm³ y $232,4 \pm 41,1$ mm³. Este día se denominó Día 1 y la dosificación se inició según el régimen predeterminado que se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Plan de tratamiento

Grupo	n	Régimen de tratamiento			
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta
1	7	Vehículo	---	PO	5 con/2 sin tratamiento
2	7	Compuesto A	5	PO	5 con/2 sin tratamiento

(continuación)

Grupo	n	Régimen de tratamiento			
		Agente	Dosis (mg/kg)	Vía	Pauta
3	7	Etopósido	24	SC	UVD × 3
4	7	Etopósido y después Compuesto A	24	SC	UVD × 3
			5	PO	5 con/2 sin tratamiento

n = número de animales; PO (*per os*) = dosificación oral; SC = dosificación subcutánea; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación hasta el final del estudio; UVD × 3= dosis una vez al día durante tres días; --- = sin administración del artículo de prueba. Se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de los animales individuales y el Compuesto A se dosificó como equivalentes de base libre en mg/kg.

Como se muestra en la Tabla 27, los ratones de control recibieron un vehículo acuoso de metilcelulosa al 0,5 % administrado por vía oral (PO) durante una pauta cinco días seguido de dos días sin dosificación, repetida hasta el final del estudio (5 con/2 sin). Un grupo de monoterapia con Compuesto A recibió 5 mg/kg de Compuesto A, PO, siguiendo una pauta de 5 con/2 sin. Un grupo de monoterapia con etopósido recibió 24 mg/kg de etopósido administrado por vía subcutánea (SC), una vez al día durante tres días consecutivos (UVD × 3). Un grupo de terapia combinada de etopósido seguida de compuesto A recibió 24 mg/kg de etopósido, SC, UVD × 3, después 5 mg/kg de Compuesto A, PO, siguiendo una pauta de 5 con/2 sin. El artículo de prueba, el Compuesto A, se preparó diariamente como la sal de benzenosulfonato (74 % de compuesto activo) suspendida en un vehículo y dosificada como mg/kg de equivalentes de base libre. En todos los grupos, se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de cada animal.

Los tumores individuales se midieron dos veces por semana en tres dimensiones usando un calibrador y se calcularon los volúmenes tumorales (VT) en mm³ usando la fórmula: VT = 0,5 × l × a × h, donde l, a y h son la longitud, la anchura y la altura en milímetros, respectivamente. Al mismo tiempo, se pesó a los animales y se controló el estado de salud de cada animal individual para detectar una pérdida de peso corporal superior al 20 % y signos de letargo mediante una exploración física. El estudio finalizó el día 195.

Cada animal de prueba se sacrificaba cuando su tumor alcanzaba el criterio de valoración de volumen de 2000 mm³ o cuando su pérdida de peso corporal superaba el 20 %. En el caso de que los animales mostrasen una pérdida de peso >10 %, su peso corporal se controlaba diariamente. El animal se sacrificaba cuando la pérdida de peso corporal era >20 % o presentaba letargo. Cuando se practicaba la eutanasia a un animal o se le encontraba muerto en la jaula (EMEJ), el volumen tumoral final registrado para el animal se incluía en los datos utilizados para calcular el volumen medio en los puntos temporales posteriores. A continuación, se trazaron curvas de crecimiento tumoral que mostraban los volúmenes tumorales medios del grupo (± error estándar de la media [EEM]) en función del tiempo y los pesos corporales medios se trazaron como el cambio porcentual desde el Día 1. Ambas representaciones gráficas se interrumpieron cuando más del 50 % de los animales evaluables de un grupo salía del estudio. Las pruebas t múltiples; corregidas para el número de comparaciones, evaluaron la significación de la diferencia en los volúmenes tumorales medios de la monoterapia con el compuesto A frente a la terapia combinada para cada punto temporal representado en las curvas de crecimiento tumoral.

El TTE (tiempo hasta el criterio de valoración) de cada ratón se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{TTE (días)} = \frac{\log_{10}(2000 \text{ mm}^3) - b}{m}$$

donde b es la intersección y m es la pendiente de la línea obtenida por regresión lineal de un volumen tumoral transformado a log₁₀ compuesto por la primera observación que superó los 2000 mm³ y las tres mediciones anteriores. A los animales encontrados muertos o sacrificados debido a la pérdida de peso corporal se les asignó un valor de TTE igual al de su día del sacrificio. A los animales que sobrevivieron al estudio se les asignó un valor de TTE igual al último día del estudio.

El resultado del tratamiento se determinó a partir del RCT, definido como el cambio en la mediana del TTE en un grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control con vehículo:

$$\text{RCT} = T - C,$$

expresado en días, o como porcentaje de la mediana del TTE del grupo de control con vehículo:

$$\% \text{ de RCT} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

donde:

T = mediana del TTE para un grupo de tratamiento, y
C = mediana del TTE para el grupo de control con vehículo.

Se construyeron gráficos de Kaplan-Meier que muestran el porcentaje de animales que permanecieron en el estudio a lo largo del tiempo. Se empleó la prueba de orden logarítmico (Mantel-Cox) para evaluar la significación de las diferencias en los gráficos de Kaplan-Meier entre grupos. Un valor de p calculado $\leq (0,05/\text{número de comparaciones})$ se consideró estadísticamente significativo. La prueba de orden logarítmico es una prueba de significación estadística y no proporciona una estimación del tamaño de la diferencia entre grupos ni una medida de significación clínica o biológica.

Los animales de prueba en el estudio se trataron de acuerdo con el protocolo de la Tabla 21 y el estudio finalizó el día 195. La Tabla 28 resume las respuestas del RCT de todos los grupos. La Figura 30 muestra curvas de crecimiento tumoral medio y la Figura 31 muestra gráficas de Kaplan-Meier de los grupos indicados. La Figura 32 presenta los cambios porcentuales del peso corporal medio del grupo desde el día 1.

Tabla 28. Resumen de respuestas del RCT

Grupo	n	Régimen de tratamiento	Mediana de ETT (días)	T-C (Días)	% de RCT
1	7	Vehículo	26	---	---
2	7	5 mg/kg de Compuesto A siguiendo una pauta de 5 con/2 sin	113	87	335
3	7	24 mg/kg de etopósido UVD \times 3	50	24	92
4	6	Etopósido y después Compuesto A	139	113	435

RCT = retraso del crecimiento tumoral; 5 con/2 sin = durante cinco días con dosificación seguido de dos días sin dosificación hasta el final del estudio; UVD \times 3 = dosis una vez al día durante tres días. Se ajustó un volumen de dosificación de 10 ml/kg al peso de animales individuales y el Compuesto A se dosificó como equivalentes de base libre de 5 mg/kg; n = número de animales evaluados en cada grupo; TTE = tiempo hasta el criterio de valoración; T-C = diferencia entre la mediana de TTE (días) de los grupos tratados frente al control; % de RCT = $(T-C)/C \times 100$; RCT máximo posible = 169 días (RCT del 650%).

Como se muestra en la Figura 31, siete tumores en ratones de control crecieron hasta el criterio de valoración de 2000 mm³ entre 25,8 y 35,7 días. Como se indica en la Tabla 23, la mediana del TTE para los ratones de control fue de 26 días, estableciendo un RCT máximo posible de 169 días (RCT del 650 %) para este estudio. El crecimiento tumoral medio avanzó rápidamente, como se observa en la Figura 30.

Como se indica en la Tabla 28, la monoterapia con compuesto A a 5 mg/kg produjo una mediana de TTE de 113 días, correspondiente a un RCT de 87 días o del 335 %. Como se muestra en la Figura 31, siete animales salieron del estudio entre 91 y 140 días. Como se indica en la Figura 31, la prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con el grupo control ($p=0,0001$). La progresión media del tumor inicialmente no tuvo restricciones hasta el día 8, y después se desaceleró antes de volverse casi estática después del día 28, como se observa en la Figura 30.

La monoterapia con etopósido a 24 mg/kg produjo una mediana de ETT de 50 días, correspondiente a un RCT de 24 días o del 92 %. Los tumores en siete animales de prueba crecieron hasta el criterio de valoración entre 45,5 y 77,3 días. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia general en comparación con el grupo de control ($p=0,0001$) y una eficacia significativamente menor en comparación con el grupo de monoterapia con Compuesto A de 5 mg/kg ($p=0,0001$). La progresión media del tumor se retrasó en comparación con la observada en el control.

El etopósido a 24 mg/kg seguido del Compuesto A a 5 mg/kg produjo una mediana de TTE de 139 días, correspondiente a un RCT de 113 días o del 435 %. Siete animales salieron del estudio entre 120 y 195 días. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia general en comparación con los grupos de control y monoterapia con etopósido ($p = 0,0001$), pero ninguna diferencia en comparación con el grupo de monoterapia con el Compuesto A ($p = 0,1677$). La progresión media del tumor fue inicialmente lenta antes de volverse casi estática después del día 28. Las pruebas t múltiples hallaron que las diferencias en los volúmenes tumorales medios en cada punto temporal para la terapia combinada de etopósido + Compuesto A en comparación con la monoterapia con Compuesto A eran significativas para los días 8-113 ($p \leq 0,004$).

Como se muestra en la Figura 32, los grupos que recibieron monoterapia con vehículo o etopósido mostraron aumentos medios de peso corporal, mientras que los grupos que recibieron el Compuesto A solo o después de etopósido experimentaron poco o ningún cambio en el peso corporal medio durante aproximadamente los primeros 100 días del estudio. En el grupo de monoterapia con compuesto A, siete animales fueron encontrados muertos o fueron sacrificados debido a una pérdida de peso corporal >20 % entre 91 y 140 días y, en el etopósido seguido del

grupo con Compuesto A, seis animales fueron encontrados muertos o fueron sacrificados debido a la pérdida de peso corporal entre 126 y 195 días.

Un examen de animales individuales no logró establecer una relación entre la carga tumoral y la pérdida de peso corporal, descartando posiblemente caquexia. Además, no se registraron observaciones clínicas compatibles con la toxicidad relacionada con el tratamiento con el compuesto A (letargo, falta de apetito y petequia). Basándose en estas observaciones, en este estudio se consideró que el compuesto A se toleraba aceptablemente.

El Compuesto A, dosificado por vía oral a 5 mg/kg siguiendo una pauta intermitente de 5 con/2 sin, como monoterapia o después de un tratamiento inicial de tres días con 24 mg/kg de etopósido, fue eficaz y aceptablemente tolerado en el modelo de xenoinjerto de CPM NCI-H1417 establecido en ratones hembra NOD scid gamma (NSG, *NOD scid gamma*).

La monoterapia con el Compuesto A oral a 5 mg/kg produjo una mediana de TTE de 113 días, correspondiente a un RCT de 87 días o del 335 % y una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con la del grupo control mediante la prueba de orden logarítmico ($p=0,0001$). La monoterapia con etopósido a 24 mg/kg produjo una mediana de ETT de 50 días, correspondiente a un RCT de 24 días o del 92 % y una diferencia significativa en la supervivencia global en comparación con la del grupo de control mediante la prueba de orden logarítmico ($p=0,0001$). La prueba de orden logarítmico encontró una eficacia significativamente menor para el grupo de monoterapia con etopósido en comparación con el grupo de monoterapia con Compuesto A de 5 mg/kg ($p=0,0001$). El etopósido seguido del Compuesto A a 5 mg/kg produjo una mediana de TTE de 139 días, correspondiente a un RCT de 113 días o del 435 %. La prueba de orden logarítmico encontró una diferencia significativa en la supervivencia global para el grupo de combinación de Compuesto A y etopósido al compararlo con los grupos de control y monoterapia con etopósido ($p=0,0001$), pero ninguna diferencia al compararlo con el grupo de monoterapia con Compuesto A ($p=0,1677$). El crecimiento tumoral medio a lo largo del estudio fue coherente con los resultados del RCT. Las evaluaciones de las diferencias en la mediana de TTE, en el crecimiento tumoral medio y en el porcentaje de animales que permanecieron en el estudio a lo largo del tiempo, revelaron que las respuestas a 5 mg/kg de Compuesto A administrado solo o después de etopósido fueron superiores a las de los restantes regímenes de tratamiento. Aunque la supervivencia global de los animales que recibieron 5 mg/kg del Compuesto A en monoterapia frente a la de la terapia combinada no fue significativamente diferente ($p = 0,1677$), los volúmenes tumorales medios los días 8-113 fueron significativamente menores para los animales de prueba que recibieron etopósido y después 5 mg/kg de Compuesto A en comparación con los que recibieron 5 mg/kg de Compuesto A solo ($p \leq 0,004$).

Los animales que recibieron monoterapia con vehículo o etopósido mostraron aumentos medios de peso corporal y salieron del estudio cuando sus tumores alcanzaron el criterio de valoración del volumen tumoral. Los animales que recibieron el Compuesto A solo o después de etopósido experimentaron poco o ningún cambio en el peso corporal medio durante aproximadamente los 100 primeros días del estudio. Los animales de ambos grupos fueron encontrados muertos o fueron sacrificados debido a una pérdida de peso corporal $>20\%$ entre 91 y 195 días. Un examen de animales individuales no logró establecer una relación entre la carga tumoral y la pérdida de peso corporal, descartando posiblemente caquexia. Además, no se registraron observaciones clínicas compatibles con la toxicidad relacionada con el tratamiento con el compuesto A (letargo, falta de apetito y petequia). Basándose en estas observaciones, en este estudio se consideró que el compuesto A se toleraba aceptablemente.

Ejemplo 18. El compuesto A aumenta la sensibilidad de las células de cáncer de próstata LNCaP a la irradiación

Las células LNCaP son células de adenocarcinoma de próstata humano sensibles a andrógenos. Las células LNCaP se trataron con el ligando del receptor de andrógenos dihidroxi testosterona (DHT; 10 nM) con o sin irradiación (2Gy) o con el Compuesto A inhibidor de LSD1 (100 nM). La proliferación de las células LNCaP se controló durante 220 horas. La Figura 33 muestra que la combinación de DHT, el compuesto A y la irradiación, muestra una mejor inhibición de la proliferación de células LNCaP en comparación con la DHT con irradiación. La Figura 34 muestra que la combinación de DHT, el compuesto A y la irradiación inhiben significativamente la proliferación de células LNCaP en comparación con la DHT junto con irradiación o la DHT junto con el Compuesto A. Estos hallazgos sugieren que el Compuesto A es eficaz en presencia del ligando del receptor de andrógenos DHT y ralentiza la proliferación de células LNCaP después de la irradiación con 2Gy.

Ejemplo 19. El compuesto A mejora la sensibilidad de las células de cáncer de próstata LNCaP al tratamiento con rapamicina.

Las células LNCaP se trataron únicamente con rapamicina 100 nM, con el Compuesto A 100 nM solo o con la combinación de rapamicina 100 nM con el Compuesto A 100 nM. La proliferación de las células LNCaP se controló durante 90 horas. Las figuras 35 y 36 muestran que la combinación de rapamicina con el Compuesto A muestra una mayor inhibición de la proliferación de células LNCaP en comparación con Rapamicina sola. Estos datos sugieren que el Compuesto A mejora la sensibilidad de las células de cáncer de próstata LNCaP al tratamiento con Rapamicina.

III. Farmacodinamia secundaria

Ejemplo 1: Efecto farmacológico del compuesto A *in vitro* en un panel de receptores, canales iónicos, transportadores de neurotransmisores, enzimas cinasas y no cinasas

La inhibición mediada por el Compuesto A de la unión de un ligando o sustrato para un panel de receptores, canales iónicos, transportadores de neurotransmisores, enzimas cinasas y no quinasas, se evaluó a 10 μM en una serie de informes de estudios CEREP. Se observó una inhibición superior al 50 % solo para el receptor muscarínico M1 (76 % de inhibición) y el canal de Na^+ (sitio 2) (62 % de inhibición). Los valores de K_i determinados para el Compuesto A frente a los del receptor muscarínico M1 y el canal de Na^+ (sitio 2) fueron de 1,6 μM y 11 μM , respectivamente. Estos valores de K_i medidos fueron más de 10.000 veces mayores que los valores de K_i observado para LSD1. Estos datos demuestran que el Compuesto A se une con alta especificidad a LSD1 en comparación con las 140 dianas probadas y que el Compuesto A es un inhibidor selectivo de LSD1.

IV. Farmacología de seguridad

Ejemplo 1: Efecto *In Vitro* del compuesto A sobre los sistemas cardiovascular y respiratorio

Se evaluaron *in vitro* los efectos del Compuesto A sobre el canal de potasio hERG (un sustituto de IKr, la corriente de potasio cardíaca rectificadora retardada de activación rápida). El compuesto A se probó a concentraciones de 0,3, 1, 3 y 10 μM en células de riñón embrionario humano (HEK293) que expresaban de manera estable canales hERG. El compuesto A inhibió la corriente hERG (media \pm error estándar de la media) en $5,9 \pm 1,3$ % a 0,3 μM ($n = 3$), $17,8 \pm 0,3$ % a 1 μM ($n = 4$), $47,0 \pm 1,9$ % a 3 μM ($n = 4$) y $77,3 \pm 0,2$ % a 10 μM ($n = 3$). Se determinó que el valor de CI_{50} para el efecto inhibitor del Compuesto A sobre la corriente hERG era de 3,4 μM (coeficiente de Hill = 1,2).

Ejemplo 2: Efecto del compuesto A sobre los parámetros hemodinámicos y electrocardiográficos en cobayas macho Dunkin Hartley

Los efectos del Compuesto A sobre los parámetros hemodinámicos y ECG se examinaron de cobayas macho Dunkin Hartley anestesiadas. A las cobayas macho se les administró IV vehículo solo (dimetilsulfóxido al 10 %, polietilenglicol 400 al 30 % en agua; $n = 4$ animales) o Compuesto A ($n = 4$ animales, administrándose a cada animal 5, 10, 15 y 20 mg base/kg) mediante una infusión de 10 minutos en la vena yugular. Se utilizó un diseño de aumento escalonado de la dosis en el que las dosis se administraron secuencialmente a intervalos de 20 minutos. Los animales se monitorizaron durante todo el experimento.

La presión arterial media (PAM) y sus componentes tendieron a disminuir durante el período de infusión del vehículo. Al final del período de monitorización, la PAM se redujo en un 24 % en comparación con el valor inicial. Con la infusión de vehículo solo, también se observó una disminución del 23 % en la FC y un aumento del 26 % en el intervalo PR al final del período de monitorización.

No se observó ningún efecto notable en la PAM o sus componentes con la administración del Compuesto A, en comparación con el vehículo del mismo tiempo. A 20 mg base/kg, el Compuesto A provocó una ligera disminución en la FC observándose una supresión máxima del 19 % a los 9 minutos del período de infusión de 10 minutos, en comparación con el vehículo. La frecuencia cardíaca permaneció reducida en un 18 % al final del período de monitorización. Se observó un notable aumento dependiente de la dosis en los intervalos QT y QTcB con dosis de 10, 15 y 20 mg base/kg del Compuesto A. Un aumento máximo del intervalo QTcB de aproximadamente 9 %, 13 % y 16 % entre 10 y 18 minutos después del inicio de la infusión se observó con el Compuesto A a dosis de 10, 15 y 20 mg base/kg respectivamente, en comparación con el vehículo del mismo tiempo. El intervalo QTcB permaneció aumentado en un 10 % al final del período de monitorización. Al final de cada infusión (10 minutos), las concentraciones plasmáticas medias fueron de 1166, 2362, 4269 y 6707 ng/ml, respectivamente, para 5, 10, 15 y 20 mg base/kg. No hubo efectos notables relacionados con el Compuesto A sobre la presión arterial, intervalo PR, duración del QRS o parámetros cualitativos del ECG. Según estos resultados, el NOAEL para los criterios de valoración hemodinámicos y de ECG fue de 10 mg base/kg después de la administración intravenosa.

Ejemplo 3: Estudio determinante de toxicidad por sonda oral de 4 semanas de duración con un período de recuperación de 4 semanas en el perro

El compuesto A se administró mediante sonda oral a 5 grupos de perros Beagle de pura raza machos y hembras (4 o 6/sexo/grupo) a niveles de dosis de 0,375, 0,75 y 1,5 mg de base/kg/dosis UVS (una vez a la semana) durante hasta 4 semanas; o de 0,375 mg base/kg/dosis DVS durante hasta 4 semanas. Los animales de control tratados con vehículo (metilcelulosa al 0,5 % en agua de ósmosis inversa) también recibieron dosis de DVS y sirvieron como controles simultáneos. Después de la última dosis, dos animales/sexo/grupo en todos los grupos excepto en el de 0,375 mg base/kg/dosis se sometieron a un período de recuperación de 4 semanas sin tratamiento.

La administración oral semanal del Compuesto A dio como resultado la eutanasia moribunda de 11 animales (1 macho a 0,375 mg base/kg/dosis administrada UVS, 2 machos y 1 hembra con 0,75 mg base/kg/dosis, y 3 machos y 4 hembras con 1,5 mg base/kg/dosis) entre los días 13 y 23 del estudio. La condición moribunda de estos animales se atribuyó a la ulceración de la mucosa gástrica y/o inflamación aguda relacionadas con el Compuesto A. Los restantes

animales sobrevivieron hasta la necropsia programada. Como resultado de la toxicidad grave en la dosis de 1,5 mg base/kg/dosis, la dosificación de este grupo se suspendió el día 15 para los 3 machos y 2 hembras restantes; estos animales permanecieron en el estudio y se sometieron a al menos 4 semanas de recuperación después de la última dosis.

Los electrocardiogramas se registraron una vez durante la fase previa a la dosis, y antes de la dosis y aproximadamente 3 horas después de la dosis para todos los animales que recibieron la dosis el día 22 de la fase de dosificación. Los electrocardiogramas se registraron utilizando ocho derivaciones y las mediciones cuantitativas habituales de los ECG se realizaron en una sola derivación. El intervalo QTc se calculó mediante el método de Fridericia. Se realizó una revisión cualitativa de anomalías del ritmo y alteraciones de los ECG recopilados.

No se encontraron anomalías relacionadas con el Compuesto A en el ritmo o la morfología de la forma de la onda o en la FC, el intervalo RR, el intervalo PR, la duración QRS, el intervalo QT o el intervalo QTc en ninguno de los niveles de dosis evaluados (es decir, < 1,5 mg base/kg/dosis). Por lo tanto, el NOAEL para cambios CV y respiratorios fueron de 0,75 mg base/kg/dosis UVS y de 0,375 mg base/kg/dosis DVS, los niveles de dosis más altos con criterios de valoración CV y respiratorios evaluados. Los valores de C_{máx} en estado estacionario a una dosis de 0,75 mg base/kg UVS fueron de 36,2 ng/ml (machos) y de 40,8 ng/ml (hembras); y a dosis de 0,375 mg base/kg DVS fueron de 17,7 ng/ml (machos) y de 19,0 ng/ml (hembras).

V. Farmacocinética y metabolismo no clínicos

Se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* para caracterizar la absorción, la FC, la distribución, la excreción y el metabolismo del compuesto A. El compuesto A es una sal de besilato de la base libre y todas las concentraciones y parámetros FC se refieren a la base libre. Para determinar las concentraciones de Compuesto A de base libre en estudios FC (farmacocinéticos) y TC (toxicocinéticos), se desarrollaron y utilizaron métodos bioanalíticos contundentes y reproducibles. Se evaluaron la farmacocinética y la biodisponibilidad oral del Compuesto A en ratones, ratas, perros y monos. Se predijeron los parámetros FC humanos y las exposiciones utilizando escalas alométricas. Los ratones y los perros fueron las especies utilizadas para la evaluación toxicológica no clínica. Se realizaron estudios *in vitro* para evaluar la absorción, el metabolismo, la unión a proteínas plasmáticas, el fenotipo de reacción CYP y el potencial de inhibición e inducción de las enzimas CYP del compuesto A. Se estudió la excreción del Compuesto A no radiomarcado en ratas.

Ejemplo 1: Absorción y farmacocinética

La FC del compuesto A se evaluó en ratones CD-1, ratas Sprague Dawley, perros Beagle y monos cangrejeros (Informe QC6688-ADME-2004) después de la administración IV y oral. La concentración plasmática del Compuesto A se determinó mediante cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas (LC-MS/MS). Los parámetros farmacocinéticos medios después de la administración IV u oral del Compuesto A se presentan en la Tabla 29 y la Tabla 30.

Tabla 29: Parámetros farmacocinéticos plasmáticos medios del compuesto A después de una sola dosis intravenosa en animales

Especie ^a	Sexo	Dosis (mg base/kg)	ABC _{última} (ng·h/ml)	ABC _∞ (ng·h/ml)	CL (ml/min/kg)	V _{ss} (ml/kg)	t _{1/2} (h)
Ratón	Hembra	5	2215	2664	32	7510	3,8
Rata	Hembra	5	680 (56)	733 (74)	115 (12)	26250 (2442)	3,6 (0,5)
Perro	Macho	1	1302 (250)	1944 (519)	9 (3)	11058 (1183)	15,5 (1,3)
Mono	Macho	1	912 (191)	983 (228)	18 (5)	17119 (1696)	12,0 (1,6)

ABC_{última} = área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo desde el tiempo cero hasta la última concentración medible; ABC_∞ = área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo extrapolada desde el tiempo 0 al infinito; CL = aclaramiento;

h = hora; FC = farmacocinética; DE = desviación estándar; t_{1/2,z} = semivida aparente de la fase terminal de la curva de concentración frente al tiempo; V_{ss} = volumen de distribución en estado estacionario.

^a En el ratón, el muestreo FC compuesto se obtuvo de n = 3 animales/punto temporal. En otras especies, los parámetros FC son de n = 3 animales y los valores mostrados son la media y la DE (entre paréntesis).

Tabla 30. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos medios del compuesto A después de una sola dosis oral en animales

Especie ^a	Sexo	Dosis ^a (mg base/kg)	t _{máx} (h)	C _{máx} (ng/ml)	ABC _{última} (ng·h/ml)	t _{1/2} (h)	% de F
Ratón	Hembra	10	0,5	510	2007	1,7	38
Rata	Hembra	5	2,0 (2,0-4,0)	47 (14)	222 (52)	3,0 (0,7)	33 (10)
	Hembra	15	2,0 (0,25-2,0)	123 (70)	570 (246)	2,9 (0,3)	28 (14)
	Hembra	50	6,0 (2,0-8,0)	621 (215)	4652 (1672)	3,0	74 (34)
Perro	Macho	1	2,0 (1,0-6,0)	69 (18)	1089 (245)	15,0 (3,0)	84 (41)
	Macho	3	1,0 (0,5-1,0)	298 (63)	3792 (674)	19,4 (4,5)	100 (80)
	Macho	6	1,0 (1,0-2,0)	627 (84)	8792 (512)	17,8 (2,4)	100 (46)
Mono	Macho	5	6,0 (6,0-6,0)	187 (49)	3618 (1537)	12,9 (2,7)	82 (70)

ABC_{última} = área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo desde el tiempo cero hasta el tiempo de la última concentración medible; C_{máx} = concentración plasmática máxima; F = biodisponibilidad oral; h = hora; FC = farmacocinética; DE = desviación estándar; t_{1/2} z = semivida aparente de la fase terminal de la curva de concentración frente al tiempo; t_{máx} = tiempo de C_{máx}. En el ratón, los parámetros FC se determinaron utilizando muestras de plasma compuestas obtenidas de n = 3 animales/punto de tiempo. En otras especies, los parámetros FC son de n = 3 animales y los valores mostrados son la media y la DE (in par)

Después de la dosificación IV, el aclaramiento sistémico del Compuesto A fue moderado en ratones, perros y monos (aproximadamente del 30 % al 40 % del flujo sanguíneo hepático) y elevado en ratas (mayor que el flujo sanguíneo hepático). El volumen de distribución de las especies varió entre 12 y 43 veces el volumen total de agua corporal, lo que sugiere una amplia distribución en los tejidos. Se observaron semividas diferentes entre roedores y no roedores, con valores que variaron entre 2 y 4 horas en roedores o entre 12 y 20 horas en no roedores.

La permeabilidad del Compuesto A en células MDR1(P-gp humana)-MDCK fue de $0,5 \times 10^{-6}$ cm/s en dirección A → B y de $16,5 \times 10^{-6}$ cm/s en dirección B → A con una relación de salida de 33, lo que indica que el Compuesto A es un sustrato de P-gp.

Después de la dosificación oral, el Compuesto A se absorbió rápidamente y bien en ratones, ratas, perros y monos con una mediana de tiempo hasta la concentración plasmática máxima (t_{máx}) entre 0,5 y 6 horas después de la dosis y la biodisponibilidad oral oscila entre el 28 % y el 74 % en roedores y entre el 82 % y el 100 % en perros y monos.

Debido a las diferentes semividas entre ratones y perros, los estudios de toxicología en ratones se realizaron después de la dosificación diaria (5 días consecutivos de dosificación por semana durante 4 semanas), mientras que los estudios en perros siguieron un régimen de dosificación de UVS, DVS o CDS durante 4 semanas. Después de múltiples dosis orales del Compuesto A a ratones, la exposición sistémica aumentó de manera proporcional a la dosis de 5 a 15 mg base/kg y de manera proporcional a la dosis de 15 a 45 mg base/kg (Informe QC6688-TOX-3001), mientras que en perros, la exposición al Compuesto A aumentó de manera proporcional a la dosis (Informe QC6688-TOX-3002, Informe-QC6688-TOX-3006). No se observó acumulación en ninguna de las especies después de la administración repetida en la pauta de dosificación utilizada en los estudios de toxicología y no se observaron diferencias de sexo en la TC en ninguna de las especies.

Ejemplo 2: Distribución

El volumen de distribución fue muy alto en ratones, ratas, perros y monos (aproximadamente de 12 a 43 veces el volumen total de agua corporal), lo que sugiere una amplia distribución del Compuesto A en los tejidos. El compuesto A se unió en alto grado (83 % en plasma humano, y de 83 % a 92 % en plasma animal) a las proteínas plasmáticas, sin diferencias notables entre especies. No se ha evaluado la distribución del Compuesto A en los tejidos ni su transporte a través de la barrera placentaria.

Ejemplo 3: Metabolismo

El metabolismo del Compuesto A se evaluó utilizando hepatocitos primarios criopreservados de ratón, rata, perro y mono macho y de ser humano de género mixto (Informe QC6688-ADME-2006). La estabilidad metabólica del Compuesto A fue mayor en ratas y perros, seguida de ser humano y monos, mientras que fue menos estable en

hepatocitos de ratón. Se identificó un único metabolito (M1; un metabolito de desaminación oxidativa) en todas las especies estudiadas excepto en ratones y, cualitativamente, los niveles de M1 formados en hepatocitos humanos eran comparables a los formados en hepatocitos de perro, una de las especies utilizadas para las pruebas de seguridad preclínicas e indica que los hepatocitos humanos no formaron ningún metabolito único.

Los estudios que utilizan enzimas CYP humanas recombinantes han demostrado que CYP3A4 parece ser la principal responsable del metabolismo oxidativo del Compuesto A con contribuciones menores de otras enzimas CYP (Informe QC6688-ADME-2006). Aún no se ha determinado el papel de las enzimas distintas del CYP en el metabolismo del Compuesto A.

Ejemplo 4: Excreción

En ratas canuladas en el conducto biliar, después de la dosificación IV del Compuesto A no radiomarcado, una media del 26,3 % de la dosis (8,5 % de la dosis en orina y 17,8 % de la dosis en bilis) se excretó intacta en el período de 24 horas posterior a la dosificación, lo que indica que el metabolismo puede desempeñar un papel importante en la eliminación del Compuesto A y la excreción del Compuesto A intacto no es el modo principal de eliminación. No se ha evaluado la excreción del Compuesto A o de sus componentes relacionados en la leche materna.

Ejemplo 5: Interacciones entre fármacos *in vitro*

El potencial de inhibición del citocromo P450 de las principales isoenzimas CYP (CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4) por el Compuesto A se evaluó utilizando microsomas de hígado humano combinados. El compuesto A (hasta 50 µM) tuvo poco o ningún efecto inhibitorio directo sobre los CYP 1A2, 2C9 y 2D6 y mostró una inhibición mínima de CYP2C19 y CYP3A4 con valores de $Cl_{50} > 50 \mu M$. Por consiguiente, a concentraciones clínicamente relevantes, no se espera que el Compuesto A cause interacciones entre fármacos debido a la inhibición de CYP.

Se evaluó el potencial de inducción del citocromo P450 del Compuesto A (0,03 a 10 µM) usando cultivos de hepatocitos humanos criopreservados y después de una incubación de hasta 3 días. Se determinó la capacidad para inducir la expresión de ARNm de los CYP1A2, 2B6 y 3A4 (Informe QC6688-ADME-2007). El compuesto A no provocó ningún aumento en el ARNm (<2 veces respecto al control del vehículo), lo que indica que el compuesto A no es un inductor de CYP1A2, 2B6 y 3A4.

Resumiendo, el Compuesto A tiene un potencial mínimo para provocar interacciones entre fármacos con fármacos administrados conjuntamente que son sustratos de CYP.

Ejemplo 6. Farmacocinética humana prevista del compuesto A

En sujetos oncológicos, basándose en los parámetros FC del Compuesto A en modelos animales y usando escalado alométrico, se predice que el Compuesto A tendrá un aclaramiento moderado (9,4 ml/min/kg) y un alto volumen de distribución (17,6 l/kg, aproximadamente 31 veces el volumen total de agua corporal). Utilizando los parámetros FC derivados de la alometría y una suposición de una biodisponibilidad oral del 80 %, la exposición sistémica en estado estacionario (ABCT) prevista del Compuesto A, después de la administración CDS de una dosis oral de 1,25 mg en un ser humano de 60 kg, es de 29 ng•h/ml.

VI. Toxicología

Se realizó una serie de estudios exploratorios y determinantes de toxicidad en ratones y perros de hasta 4 semanas, y un estudio de toxicidad genética *in vitro* para caracterizar el perfil de toxicidad del Compuesto A. Los estudios *in vivo* se realizaron por vía, ya que es la vía de administración prevista en los ensayos clínicos. Se realizaron estudios determinantes de toxicidad (dosis repetida oral de 4 semanas con un período de recuperación de 4 semanas; ratones y perros) utilizando el Compuesto A administrado siguiendo una pauta de UVDx5/semana o CDDx3/semana en ratones, y de UVS, DVS o CDS en perros. Se realizaron estudios determinantes de toxicidad de acuerdo con los requisitos de las Regulaciones GLP de la FDA de los Estados Unidos para estudios de laboratorio no clínicos (21 CFR Parte 58), los Principios de BPL de la OCDE, ENV/MC/CHEM(98)17 (revisado en 1997, emitido en enero de 1998), y la directriz ICH S9, 2009.

Ejemplo 1: estudio de toxicidad de 4 semanas con un período de recuperación de 4 semanas en ratones

El compuesto A se administró mediante sonda oral a ratones CrI:CD1(ICR) macho y hembra (10 o 15/sexo/grupo) a niveles de dosificación de 0, 5, 15 y 45 mg base/kg/dosis, o a de 25 mg base/kg/dosis. Un esquema de dosificación fue UVDx5/semana durante un total de 4 semanas (niveles de dosificación de 5, 15 y 45 mg base/kg/dosis). Los animales se sacrificaron al día siguiente de la administración de la dosis final del cuarto ciclo. A otro grupo de animales se le administraron 25 mg base/kg/dosis CDDx3/semana durante un total de 4 semanas y se sacrificaron al día siguiente de la dosis final. A la dosificación le siguió un período de recuperación de 4 semanas (5/sexo/grupo a niveles de dosificación de 0, 15, 45 o 25 mg base/kg/dosis).

Los animales adicionales (6/sexo en el grupo de control, y 36/sexo/grupo en los grupos de artículos de ensayo) para la evaluación de la TC se dosificaron con el mismo programa que los animales de toxicidad durante un máximo de 26 días.

- 5 La evaluación de la toxicidad se basó en la mortalidad, observaciones clínicas, peso corporal, consumo de alimento, evaluaciones oftálmicas y patología clínica y anatómica. Se recogieron muestras de sangre de animales TC para evaluaciones de TC.

- 10 Cinco animales (4 machos y 1 hembra) a los que se les administró 45 mg de base/kg/dosis se sacrificaron en estado moribundo ya en el día 7 de la fase de dosificación debido a la toxicidad relacionada con el Compuesto A. Todos estos eran animales del subgrupo TC. Las observaciones clínicas de estos animales fueron: delgado, atáxico, encorvado, hipoactivo, ojos entrecerrados, pelaje áspero, orejas/cuerpo pálidos y/o piloerección. Dado que estos eran los animales del subgrupo TC, no fueron examinados histológicamente. Una hembra de 25 mg base/kg/dosis fue sacrificada el día 20 de la fase de dosificación debido al uso limitado de su pata trasera derecha, un hallazgo en consonancia con una lesión y, por lo tanto, este sacrificio no programado no se consideró relacionado con el Compuesto A. No hubo mortalidades no programadas relacionadas con el Compuesto A en animales del subgrupo de toxicidad.

No hubo efectos oftalmológicos relacionados con el artículo de prueba.

- 20 Todos los demás hallazgos relacionados con el artículo de prueba se presentan a continuación. Hallazgos adversos relacionados con el compuesto A:

- Pelo áspero a ≥ 15 mg base/kg/dosis, piloerección y aspecto encorvado a ≥ 25 mg base/kg/dosis, orejas/cuerpo pálidos y aspecto delgado a 45 mg base/kg/dosis.
- 25 • Disminuciones marcadas en los recuentos de plaquetas y reticulocitos con 45 mg de base/kg/dosis.
- Fibrosis mínima a marcada en el espacio medular del esternón, asociado a una disminución mínima a moderada del tejido hematopoyético (hipocelular) en las esternebras afectadas a 15 y 45 mg de base/kg/dosis.
- Aumento mínimo a moderado del periostio, endostio y hueso laminar trabecular (hiperostosis) con osteoblastos activados a 15 y 45 mg base/kg/dosis.
- 30 • Hiperplasia mieloide mínima a moderada en la médula ósea del esternón a ≥ 15 mg base/kg/dosis.
- Fibrosis moderada en la médula ósea femoral a 45 mg de base/kg/dosis (un macho).
- Agotamiento mínimo a marcado de linfocitos de la zona marginal en el bazo de machos a 15 mg base/kg/dosis, de hembras a 25 mg base/kg/dosis, y de machos y hembras a 45 mg base/kg/dosis.

- 35 Los hallazgos relacionados con el compuesto A que se consideraron no adversos porque se produjeron en un solo día, eran autolimitados, no tenían consecuencias toxicológicas, eran de pequeña magnitud y/o no tenían un indicador microscópico, consistían en lo siguiente:

- Pérdida de peso corporal medio a 45 mg base/kg/dosis (8,6 % y 12,6 % menos en comparación con los controles de machos y hembras, respectivamente, el día 27).
- 40 • Disminución leve a moderada de la masa eritrocitaria (cifra de GR, hemoglobina y hematocrito) a ≥ 5 mg base/kg/dosis.
- Plaquetas y reticulocitos absolutos de leve a moderadamente bajos a 5 y 15 mg base/kg/dosis.
- Hemoglobina corpuscular media mínima a ligeramente más baja, concentración media de hemoglobina corpuscular y recuento absoluto de neutrófilos (también en machos a los que se les administraron 5 mg de base/kg/dosis) en animales a los que se les administró ≥ 15 mg base/kg/dosis y un recuento absoluto de monocitos mínimamente superior en machos a los que se les administraron 15 o 25 mg base/kg/dosis y hembras a las que se les administró ≥ 5 mg de /kg/dosis.
- 45 • Proteína total mínimamente reducida a 25 mg base/kg/dosis y albúmina mínimamente reducida a 25 o 45 mg base/kg/dosis.
- 50 • Aumentos mínimos o leves (número y/o tamaño) de megacariocitos en la médula ósea del esternón a ≥ 5 mg base/kg/dosis.
- Disminución del peso de las vesículas seminales a ≥ 15 mg base/kg/dosis (sin correlación microscópica).
- Disminución del peso del útero a 15 y 45 mg base/kg/dosis (sin correlación microscópica).
- 55 • Disminución del peso de los testículos a 15 o 45 mg base/kg/dosis únicamente en el sacrificio de recuperación (sin correlación microscópica).
- En el bazo, aumento de la hematopoyesis extramedular (mínimo a marcado) a ≥ 15 mg base/kg/dosis y en una hembra a 5 mg base/kg/dosis; correlacionado con un aumento del peso absoluto y relativo del bazo a 15 o 45 mg base/kg/dosis.

- 60 Todos los hallazgos relacionados con el artículo de prueba demostraron una reversibilidad parcial a completa después de un período sin tratamiento de 4 semanas.

Los datos TC (toxicocinéticos) del compuesto A se resumen en la Tabla 31.

La exposición al Compuesto A aumentó con el aumento del nivel de dosis de 5 a 45 mg base/kg/dosis. Los aumentos de los valores de $C_{\text{máx}}$ y ABC_{0-24} fueron generalmente mayores que la dosis proporcional de 5 a 15 mg base/kg/dosis, y aproximadamente la dosis proporcional de 15 a 45 mg base/kg/dosis. No se observaron diferencias de sexo consistentes en los valores medios de $C_{\text{máx}}$ y ABC_{0-24} del Compuesto A. No se observó acumulación del Compuesto A después de múltiples dosis del Compuesto A en ratones.

Basándose en la mortalidad, en los signos clínicos de toxicidad, en la hematología y en los hallazgos histopatológicos, la STD_{10} fue > 45 mg base/kg/dosis (correspondiente a valores medios de $C_{\text{máx}}$ y ABC_{0-24} en estado estacionario de 2.620 ng/ml y 29.000 ng·h/ml, y 2.130 ng/ml y 26.500 ng·h/ml, en machos y hembras respectivamente) siguiendo una pauta UVDx5/semana, y fue > 25 mg base/kg/dosis (correspondiente a valores medios de $C_{\text{máx}}$ y ABC_{0-24} en estado estacionario de 1.450 ng/ml y 17.800 ng·h/ml, y 1.740 ng/ml y 17.500 ng·h/ml, en machos y hembras respectivamente) siguiendo una pauta semanal de CDDx3. El NOAEL fue de 5 mg base/kg/dosis (correspondiente a valores medios de $C_{\text{máx}}$ y ABC_{0-24} en estado estacionario de 276 ng/ml y 2.010 ng·h/ml y de 276 ng/ml y 2.410 ng·h/ml, respectivamente, en machos y hembras respectivamente) siguiendo un esquema de UVDx5/semana. No se identificó ningún NOAEL para la pauta de CDDx3/semana.

Tabla 31. Resumen de parámetros toxicocinéticos del compuesto A después de la dosificación oral en ratones

Intervalo (Día)	Nivel de dosis (mg base/kg/dosis)	Sexo	$C_{\text{máx}}$ (ng/ml)	ABC_{0-24} (ng·h/ml)
1	5	M	230	2270
		H	201	1500
	15	M	1020	13000
		H	850	9680
	45	M	3130	35200
		H	3570	36300
	25 ^a	M	1530	21900
		H	1830	20300
26	5	M	276	2010
		H	276	2410
	15	M	628	7960
		H	769	8640
	45	M	2620	29000
		H	2130	26500
	25 ^a	M	1450	17800
		H	1740	17500

ABC_{0-24} = Área bajo la curva de la concentración plasmática desde tiempo de cero a 24 horas; $C_{\text{máx}}$ = concentración plasmática máxima; H = Hembra; h = hora; M = Macho; CDD = cada dos días. Los animales a los que se les administró una dosis de 25 mg base/kg recibieron una dosis CDDx3/semana. Los restantes grupos de dosis recibieron una dosis de 5 con/2 días sin tratamiento por semana. Los animales se retiraron al día siguiente de la administración de la última dos.

Ejemplo 2: Estudio de toxicidad de 4 semanas con un período de recuperación de 4 semanas en perros

En un estudio inicial, el compuesto A se administró mediante sonda oral a 5 grupos de perros Beagle de raza pura macho y hembra (4 o 6/sexo/grupo) a niveles de dosis de 0, 0,375, 0,75 o 1,5 mg base/kg/dosis UVS durante hasta 4 semanas; o de 0,375 mg base/kg/dosis DVS durante hasta 4 semanas. Después de la última dosis, se programó un periodo de recuperación de 4 semanas sin tratamiento para 2 animales/sexo/grupo en todos los grupos excepto en el de 0,375 mg base/kg/dosis UVS.

La administración oral semanal del Compuesto A dio como resultado la eutanasia moribunda de 11 animales (1 macho a 0,375 mg base/kg UVS, 2 machos y 1 hembra a 0,75 mg base/kg, y 3 machos y 4 hembras a 1,5 mg base/kg) entre los días 13 y 23 del estudio. La condición moribunda de estos animales se atribuyó a la ulceración de la mucosa gástrica y/o inflamación aguda relacionadas con el Compuesto A. Como resultado de la toxicidad grave en el grupo de 1,5 mg base/kg/dosis, la dosificación de este grupo se suspendió el día 15 (antes de la tercera dosis programada) para los 3 perros y 2 hembras supervivientes; estos animales permanecieron en el estudio y se sometieron a al menos 4 semanas de recuperación después de la última dosis. Los restantes animales sobrevivieron hasta la necropsia programada.

Se observaron resultados adversos en todos los niveles de dosis y programas (es decir, $\geq 0,375$ mg base/kg/dosis, UVS o DVS). Las toxicidades primarias consistieron en ulceración de la mucosa, inflamación aguda y/o subaguda y atrofia epitelial mucosa de los tejidos del tubo GI.

5 Los siguientes cambios en animales a los que se les administró $\geq 0,375$ mg base/kg/dosis (UVS o DVS) se consideraron relacionados con el Compuesto A, se observaron en animales sacrificados en estado moribundo y/o animales que sobrevivieron hasta la necropsia programada, y se consideraron adversos:

- 10 • hipoactividad, aspecto delgado, vómitos, heces rojas/negras/líquidas/no formadas/mucoides, deshidratación, pérdida de peso corporal, disminución del consumo de alimento, pirexia y/o evidencia de malestar en el tubo GI.
- Hallazgos hematológicos de masa de glóbulos rojos de leve a moderada, recuento de plaquetas de leve a marcadamente disminuido, recuento de reticulocitos notablemente disminuido, recuentos de eosinófilos leve a moderadamente disminuidos, aumento de leve a moderado de los recuentos absolutos de monocitos y de células grandes no teñidas, recuentos de neutrófilos de moderada a marcadamente disminuidos (a 2 hembras se les administró 1,5 mg base/kg/dosis) o recuentos de neutrófilos de leve a moderadamente aumentados (otros animales a los que se les administró $\geq 0,375$ mg base/kg/dosis).
- 15 • En la bioquímica clínica se observó una disminución leve a moderada de la albúmina y de la relación albúmina:globulina, una disminución leve del calcio, una disminución leve a moderada del fósforo inorgánico, un aumento leve a moderado del colesterol y un aumento mínimo a leve de la actividad de la fosfatasa alcalina.
- 20 • Ulceración de la mucosa de leve a marcada y/o inflamación aguda moderada en el estómago.
- Inflamación y ulceración aguda o subaguda de mínima a marcada en el yeyuno, íleon, intestino ciego, colon y/o recto.
- Atrofia epitelial mucosa de leve a moderada en el yeyuno y/o íleon.
- Ligera ulceración en el esófago (a 1 hembra se le administraron 1,5 mg base/kg/dosis).

25 Se observaron los siguientes cambios en los animales a los que se les administró $\geq 0,375$ mg base/kg/dosis (UVD o DVS) que sobrevivieron a su respectiva necropsia y se consideraron relacionados con el Compuesto A, pero no se consideraron adversos por ser de baja magnitud y/o incidencia, no tuvieron consecuencias y/o no tuvieron un indicador microscópico:

- 30 • Hallazgos hematológicos de masa de glóbulos rojos de mínima a leve (animales a los que se les administraron 0,375 mg base/kg/dosis UVS [solo machos] o DVS, a las hembras a las que se les administraron 0,75 mg base/kg/dosis y a los machos a los que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis), recuento absoluto de reticulocitos levemente disminuido (a las hembras a las que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis), aumento leve a moderado del recuento de plaquetas (a los machos a los que se les administraron 0,375 mg base/kg/dosis UVS o DVS y en animales a los que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis), aumento leve de los recuentos de glóbulos blancos (GB) y de células grandes no teñidas (machos a los que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis).
- 35 • Hallazgos de bioquímica clínica de globulina mínimamente aumentada (animales a los que se les administraron 0,375 mg base/kg/dosis UVS, hembras a las que se les administraron 0,75 mg base/kg/dosis, y animales a los que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis), colesterol levemente aumentado (a las hembras a las que se les administraron 0,75 mg base/kg/dosis), actividad de fosfatasa alcalina mínimamente aumentada (a las hembras a las que se les administraron 0,375 mg base/kg/dosis DVD o 0,75 mg base/kg/dosis y a los animales a los que se les administraron 1,5 mg de base/kg/dosis), calcio mínimamente disminuido (a los machos a los que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis), fósforo inorgánico levemente disminuido (a las hembras a las que se les administraron 0,75 mg base/kg/dosis).
- 40
- 45

50 Otros hallazgos en los animales que fueron sacrificados por estar moribundos se atribuyeron a una respuesta inflamatoria (hematopoyesis extramedular en el bazo y aumento de la proporción mieloide:eritroide en la médula esternal), septicemia secundaria a ulceración de la mucosa en el tubo GI (inflamación en múltiples ganglios linfáticos, edema SC o inflamación aguda en el corazón o el hígado) y/o estrés asociado a la condición moribunda (agotamiento de linfocitos en el timo).

55 No hubo efectos relacionados con el Compuesto A sobre el peso corporal medio, consumo de alimento, coagulación, análisis de orina, electrocardiografía, oftalmología, observaciones macroscópicas, o pesos de órganos en cualquiera de los animales que sobrevivieron hasta su necropsia programada a $\geq 0,375$ mg base/kg/dosis.

Todos los hallazgos anteriores mostraron una recuperación completa después de un período sin tratamiento de 4 semanas.

60 La exposición al compuesto A, cuando se dosifica semanalmente, aumentó de manera dependiente de la dosis de 0,375 a 1,5 mg base/kg/dosis el día 1 y de 0,375 a 0,75 mg base/kg/dosis el día 22. Las exposiciones fueron comparables entre machos y hembras y no se observaron diferencias consistentes en los parámetros TC. No se observó acumulación del Compuesto A después de múltiples dosis del Compuesto A en perros. En la Tabla 32, se

presenta un resumen de los parámetros TC. Los perfiles de concentración frente al tiempo en animales a los que se les administraron 0,375 mg base/kg/dosis UVS fueron similares a los de los animales a los que se les administraron 0,375 mg base/kg/dosis DVD los días 1 y 22.

5 **Tabla 32. Resumen de los parámetros toxicocinéticos medios del compuesto A después de la dosificación oral en perros en el estudio de toxicidad de 4 semanas con un período de recuperación de 4 semanas**

Intervalo (Día)	Nivel de dosis (mg base/kg/dosis)	Sexo	C _{máx} (ng/ml)	ABC ₀₋₁₆₈ (ng·h/ml)	ABC ₀₋₇₂ (ng·h/ml)
1	0,375	M	17,2	503	NC
		H	17,2	435	NC
	0,75	M	34	955	NC
		H	41,6	1180	NC
	1,5 ^a	M	90,6	2530	NC
		H	80,0	2680	NC
22	0,375 ^b	M	16,9	NC	420
		H	15,2	NC	383
	0,375	M	21,9	384	NC
		H	15,5	269	NC
	0,75	M	36,2	645	NC
		H	40,8	719	NC
	0,375 ^b	M	17,7	NC	307
		H	19,0	NC	296

AUC₀₋₁₆₈ = área bajo la curva de concentración plasmática desde el tiempo cero hasta las 168 horas; AUC₀₋₇₂ = área bajo la curva de concentración plasmática desde el tiempo cero hasta las 72 horas; C_{máx} = concentración plasmática máxima; H = Hembra; h = hora; M = Macho; NC = No calculado.

^a Los animales a los que se les administraron 1,5 mg base/kg/dosis recibieron dos dosis y después comenzaron la recuperación el día 15. Por lo tanto, no hay datos toxicocinéticos disponibles del día 22

^b En este grupo, los animales recibieron dos dosis dos veces por semana, en comparación con una vez por semana en todos los demás grupos de dosis.

Basándose en los signos clínicos de toxicidad, mortalidad, efectos adversos sobre el peso corporal, patología clínica e histopatología a dosis UVS $\geq 0,375$ mg base/kg/dosis, no se determinaron ni la DMNET ni el NOAEL para el programa de dosis UVS o DDS (es decir, fueron $< 0,375$ mg base/kg/dosis). La pauta de UVS de 0,375 mg base/kg/dosis correspondió a valores medios respectivos de C_{máx} y ABC₀₋₁₆₈ de 21,9 ng/ml y 384 ng·h/ml (machos), y de 15,5 ng/ml y 269 ng·h/ml (hembras), respectivamente, el día 22 de la fase de dosificación; la pauta de DVS de 0,375 mg base/kg/dosis correspondió a valores medios respectivos de C_{máx} y ABC₀₋₇₂ de 17,7 ng/ml y 307 ng·h/ml (machos), y de 19,0 ng/ml y 296 ng·h/ml (hembras), respectivamente, el día 22 de la fase de dosificación.

Ejemplo 3. Estudio de toxicidad de 4 semanas (sin período de recuperación) en perros

En un segundo estudio con perros, el compuesto A se administró mediante sonda oral a 4 grupos de perros Beagle de raza pura machos y hembras (4/sexo/grupo) a niveles de dosis de 0, 0,125 o 0,25 mg base/kg/dosis UVS (a un total de 5 dosis), o 0,5 mg base/kg/dosis DVS (a un total de 3 dosis) durante al menos 4 semanas (Informe QC6688-TOX-3006). Todos los animales sobrevivieron hasta el sacrificio terminal.

No hubo cambios relacionados con el Compuesto A en las observaciones clínicas, en los parámetros de peso corporal, consumo de alimento, pesos de órganos, coagulación, bioquímica clínica, parámetros de análisis de orina o hallazgos macroscópicos.

Los siguientes cambios se consideraron resultado de la administración del Compuesto A:

- Hallazgos adversos relacionados con el tratamiento:
 - Inflamación aguda moderada en el íleon e inflamación aguda marcada en el ciego (a una sola hembra se le administraron 0,25 mg base/kg/dosis UVS)
 - Inflamación aguda mínima en el ciego (a un solo macho se le administraron 0,5 mg base/kg/dosis CDS)
- Relacionados con el tratamiento pero no considerados adversos debido a su baja magnitud/gravedad y/o sin correlación microscópica:

- Aumento mínimo del recuento absoluto de plaquetas (0,5 mg base/kg/dosis administrada CDS)
- Aumento mínimo en el recuento absoluto de monocitos (a las hembras a las que se les administraron 0,25 mg base/kg/dosis UVS)
- Aumento mínimo de la hematopoyesis extramedular (a cuatro animales se les administraron 0,5 mg base/kg/dosis CDS y a una sola hembra se les administraron 0,25 mg base/kg/dosis UVS)
- Ligero aumento de la proporción mieloide:eritroide en la médula ósea del esternón y el fémur (a una sola hembra se le administraron 0,25 mg base/kg/dosis UVS).

En la Tabla 33, se presenta un resumen de los parámetros TC.

Tabla 33. Resumen de los parámetros toxicocinéticos medios del compuesto A después de la dosificación oral en perros en el estudio de toxicidad de 4 semanas (sin período de recuperación)

Intervalo (Día)	Nivel de dosis (mg base/kg/dosis)	Sexo	C _{máx} (ng/ml)	ABC ₀₋₉₆ (ng·h/ml)
1	0,125	M	5,81	114
		H	5,77	127
		Sexos combinados	5,79	120
	0,25	M	11,9	335
		H	12,1	343
		Sexos combinados	12,0	339
	0,5 ^a	M	24,0	762
		H	26,6	729
		Sexos combinados	25,3	746
15	0,125	M	4,89	107
		H	5,54	141
		Sexos combinados	5,26	127
	0,25	M	10,5	302
		H	11,5	272
		Sexos combinados	11,0	287
	0,5*	M	22,7	653
		H	21,4	618
		Sexos combinados	22,0	636

AUC₀₋₉₆ = área bajo la curva de concentración plasmática desde el tiempo cero hasta las 96 horas; C_{máx} = concentración plasmática máxima; H = Hembra; h = hora; M = Macho; CDS = una vez cada dos semanas; UVS = una vez por semana.

^a Los animales a los que se les administraron 0,5 mg base/kg/dosis recibieron una dosis CDS durante 4 semanas (2 dosis en total). A otros grupos se les administraron dosis UVS.

La exposición al Compuesto A aumentó con el aumento del nivel de dosis de 0,125 a 0,5 mg base/kg/dosis el día 1, y los aumentos en los valores medios de C_{máx} y ABC₀₋₉₆ fueron aproximadamente proporcionales a la dosis. El día 15, la exposición al Compuesto A aumentó con el aumento del nivel de dosis de 0,125 mg base/kg/dosis UVS a 0,5 mg base/kg/dosis CDS, y los aumentos fueron aproximadamente proporcionales a la dosis. No se observaron diferencias de sexo consistentes en los valores medios de C_{máx} ni del ABC₀₋₉₆. No se observó acumulación del Compuesto A después de múltiples dosis.

Basándose en los hallazgos microscópicos adversos (inflamación en el íleon y/o ciego) de una sola hembra con 0,25 mg base/kg/dosis (administración UVS) y de un solo macho con 0,5 mg base/kg/dosis (administración CDS), se consideró que el NOAEL de administración UVS era de 0,125 mg base/kg/dosis, correspondientes a los valores combinados medios de C_{máx} y ABC del día 15 de 5,26 ng/ml y 127 ng·h/ml, respectivamente. No se determinó el NOAEL de administración CDS (es decir, < 0,5 mg base/kg/dosis). Para la dosificación de UVS, la DMNET fue de 0,25 mg base/kg/dosis UVS, correspondiente a los valores combinados medios de C_{máx} y ABC del día 15 de 11,0 ng/ml y 287 ng·h/ml, respectivamente. Para la administración CDS, la DMNET fue de 0,5 mg base/kg/dosis, correspondiente a los valores combinados medios de C_{máx} y ABC del día 15 de 22,0 ng/ml y 636 ng·h/ml, respectivamente.

Ejemplo 4: Genotoxicidad *In Vitro*

Se encontró que el compuesto A era negativo en cuanto a mutagenicidad en un ensayo de mutación inversa bacteriana (utilizando *Salmonella typhimurium* cepas TA98 y TA100) hasta la concentración máxima probada de 500 µg/ml, tanto en presencia como en ausencia del sistema de activación metabólica de mamíferos exógeno S9.

Ejemplo 5. Estudio exploratorio de toxicidad en ratones

El propósito de este estudio fue determinar la tolerabilidad y la TC del Compuesto A cuando se administra mediante sonda oral a ratones CD-1 machos y hembras en dos programas de dosis diferentes. Una pauta consistió en 5 días consecutivos de dosificación, seguido de un descanso farmacológico de 2 días, seguido de 5 días más de dosificación consecutiva (5 días con/2 días); otra pauta consistió en una dosificación los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12 (CDDx3/semana). Los animales se sacrificaron al día siguiente de administrar la dosis final.

El compuesto A se administró a grupos de 6 ratones/sexo/grupo a niveles de dosis de 0, 10, 30 o 60 mg/kg/dosis siguiendo una pauta de 5 días con/2 días sin tratamiento; o 60 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de CDD. Se incluyeron animales adicionales para la evaluación de TC.

Todos los ratones sobrevivieron hasta el sacrificio programado con la excepción de un único animal TC. Se confirmó que el traumatismo por sonda forzada fue la causa de morbilidad en el animal TC; por lo tanto, esta muerte temprana se consideró no relacionada con el Compuesto A.

Se observó una ligera reducción, dependiente de la dosis, en el aumento o la pérdida de peso corporal en todos los niveles de dosis en la pauta de 5 días con/2 días sin. A la dosis de 60 mg/kg, hubo una reducción menos intensa del aumento de peso corporal con la pauta de CDD en comparación con la de 5 días con/2 días sin (tratamiento). No se observaron observaciones clínicas relacionadas con el artículo de prueba a lo largo de este estudio.

Se observaron cambios en varios parámetros hematológicos en ratones macho y hembra a los que se les administró el Compuesto A.

Las plaquetas circulantes se redujeron en los ratones en todos los niveles de dosis al final del estudio. El efecto se redujo ligeramente en ratones a los que se les administraron dosis de 60 mg/kg CDD en comparación con una dosis de 60 mg/kg de 5 días con/2 días sin. A 10 mg/kg/día, 5 días con/2 días sin, hubo un aumento > 2 veces en las plaquetas el día 8 (después del descanso farmacológico de 2 días y en comparación con el final del primer período de dosificación); al final del segundo período de dosificación, los niveles de plaquetas eran similares a los de otros grupos tratados con el Compuesto A. Un aumento en el volumen medio de plaquetas, sugestivo de trombopoyesis regenerativa, generalmente vino acompañado de la reducción de plaquetas en todos los niveles de dosis al final del estudio, con la mayor respuesta a 60 mg/kg/dosis.

Los parámetros de glóbulos rojos (cifra de GR, hematocrito y hemoglobina) generalmente se redujeron a dosis de 30 y 60 mg/kg, 5 días con/2 días sin. En general, se observó una reducción dependiente de la dosis en los recuentos y porcentajes de reticulocitos en todos los niveles de dosis siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin tratamiento. Los efectos sobre los parámetros de GR y/o reticulocitos fueron menos evidentes con 60 mg/kg/dosis CDD.

Se observó una reducción dependiente de la dosis en los recuentos de neutrófilos en todos los grupos tratados con el Compuesto A siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin, siendo la mayor reducción aproximadamente del 90 % en comparación con los controles simultáneos y los valores previos al estudio. A 60 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de CDD, la reducción osciló entre el 66 % (hembras) y el 83 % (machos) en comparación con los controles simultáneos.

Los monocitos aumentaron en todos los niveles de dosis, con el mayor efecto a 30 y 60 mg/kg/dosis, 5 días con/2 días sin. Aunque los datos eran muy variables, los recuentos de basófilos parecieron aumentar en la mayoría de los ratones con dosis de 60 mg/kg, 5 días con/2 días sin.

Se presentaron cambios microscópicos relacionados con el compuesto A en el esternón (hueso y médula), fémur (médula) y bazo.

En la médula ósea del esternón de ratones a los que se les administró el Compuesto A siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin, se observó infarto en ratones con 60 mg/kg/dosis y en la mayoría de los ratones con 30 mg/kg/dosis. Hubo una respuesta a la dosis en la incidencia de animales afectados y el número de esternones afectados. Las esternones afectadas también mostraron una formación de tejido óseo perióstico entre mínima y leve. En el fémur de 1 ratón macho y de 2 hembras con dosis de 60 mg/kg, 5 días con/2 días sin y de 1 ratón macho con dosis de 30 mg/kg/dosis, se detectó fibrosis medular leve en la diáfisis subfisaria. En el bazo, a dosis de 30 o 60 mg/kg, 5 días con/2 días sin, hubo un aumento entre mínimo y moderado en la mielopoyesis dentro de la pulpa roja, correlacionándose con un aumento del peso del bazo (hasta 2 veces) en estos grupos. Se observó mielopoyesis esplénica mínima en 1 macho a 10 mg/kg/dosis. (Se observó un agotamiento linfoide leve o moderado en la corteza tímica de individuos que recibieron una dosis de 60 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin tratamiento, y en una sola mujer que recibió una dosis de 30 mg/kg/dosis). Se observó un aumento mínimo de la apoptosis de linfocitos en los folículos germinales de los ganglios linfáticos mandibulares y mesentéricos de machos ocasionales a los que se administró una dosis de 60 mg/kg siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin. Los cambios en el timo y en los ganglios linfáticos se consideraron inespecíficos y en consonancia con la respuesta al estrés general en los animales afectados.

Resumiendo, no se observaron diferencias de sexo consistentes en la TC. La exposición sistémica (ABC_{0-24} y $C_{m\acute{a}x}$) aumentó con la dosis de 10 a 60 mg/kg/dosis el día 1 y el día 12 tanto en machos como en hembras. Tras la dosificación repetida del Compuesto A, no se observó acumulación. Se observaron efectos mínimos relacionados con el Compuesto A en ratones con dosis de 10 mg/kg/dosis (5 días con/2 días sin) y generalmente incluyeron aumento de peso reducido, plaquetas circulantes reducidas, neutrocitopenia, reticulocitopenia y un aumento mínimo de la mielopoyesis esplénica en un solo macho. Los efectos relacionados con el compuesto A en ratones con dosis de 30 y 60 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de dosificación de 5 días con (tratamiento)/2 días sin (tratamiento) generalmente incluyeron pérdida de peso corporal, plaquetas circulantes reducidas, parámetros de GR reducidos (GR, hematocrito, hemoglobina, reticulocitos), neutrocitopenia, monocitosis y efectos microscópicos en el hueso esternal (formación de tejido óseo perióstico), médula ósea esternal (infarto), fémur (fibrosis medular) y bazo (aumento de mielopoyesis). La dosis de 60 mg/kg CDD produjo una reducción del aumento de peso, reducción de plaquetas y neutrófilos y aumento de monocitos. La magnitud de estos efectos se redujo en comparación con la de los ratones que seguían la pauta de 5 días con/2 días con.

Ejemplo 6: Estudio exploratorio de toxicidad en perros

El propósito de este estudio fue determinar la tolerabilidad y la TC del Compuesto A cuando se administra mediante sonda oral a perros Beagle machos y hembras sin tratamiento previo siguiendo 2 pautas de dosificación diferentes. Las pautas comparadas consistieron en dosificación los días 1, 3, 5, 8, 10 y 12 (CDDx3/semana) o 5 días consecutivos de dosificación, seguido de un descanso farmacológico de 2 días, seguido de 5 días más de dosificación consecutiva (5 días con/2 días sin) (Informe SW14-1929). Los animales se sacrificaron al día siguiente de administrar la dosis final.

El compuesto A se administró a grupos de 2 perros/sexo/grupo a niveles de dosis de 0, 0,25, 0,5 o 1,0 mg/kg/dosis CDD, o de 0,5 mg/kg/dosis 5 días con/2 días sin.

Una perra que recibió una dosis de 0,5 mg/kg/día, siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin (tratamiento), se sacrificó por estar moribunda en la noche del día 12 debido a signos clínicos adversos (gravemente hipoactiva, frecuencia respiratoria reducida, frío al tacto), pérdida de peso corporal (10,8 %) y reducción del consumo de alimento. Los hallazgos microscópicos fueron generalmente coherentes con una respuesta a una marcada trombocitopenia (observada entre los días 9 y 12 en este perro) e incluyeron hemorragia en una variedad de tejidos, incluidos los ganglios axilares, mandibulares y mesentéricos, la lámina propia del estómago y la submucosa de la vejiga urinaria. Adicionalmente, este animal presentaba atrofia hepatocelular, probablemente secundaria a anorexia/pérdida de peso. También hubo un agotamiento linfocítico timico moderado, correlacionado con observaciones hematológicas de linfopenia y probablemente fue secundario al estrés general en este animal. La moribundez se consideró relacionada con el Compuesto A.

Los restantes perros sobrevivieron hasta el sacrificio programado el día 13. Se observó pérdida de peso relacionada con el compuesto A en perros individuales, principalmente a 0,5 mg/kg/dosis con la pauta de 5 días con/2 días sin (tratamiento). La reducción del consumo de alimento se observó principalmente en hembras en todos los niveles de dosis y pautas; el consumo de alimento solo se redujo en un macho al que se le administraron 0,5 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de 5 días con /2 días sin, durante los dos últimos días del estudio.

Generalmente se detectaron observaciones clínicas anómalas los días 11 a 13 en animales que recibieron dosis de 1 mg/kg/dosis CDD o dosis de 0,5 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin, y consistieron principalmente en hemorragia (o equimosis) petequiral o equimótica en los labios, encías, escroto, abdomen y alrededor de las glándulas mamarias.

Se observaron recuentos reducidos de plaquetas a 0,5 mg/kg/dosis (ambas pautas) y a 1 mg/kg/dosis alrededor del día 5; los recuentos continuaron reduciéndose a lo largo del estudio a menos de 25.000/ μ l (trombocitopenia marcada) en la mayoría de los perros a estos niveles de dosis. No hubo reducción en el recuento de plaquetas a 0,25 mg/kg/dosis. Se observó una ligera reducción en los parámetros de GR (cifra de GR, hematocrito y hemoglobina) en algunos animales que recibieron dosis de 1 mg/kg/dosis CDD o de 0,5 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin hacia el final del estudio. Las cifras de leucocitos, principalmente neutrófilos, generalmente se redujeron en las hembras solo con 1 mg/kg/dosis CDD o 0,5 mg/kg/dosis 5 días con/2 días sin hacia el final del estudio.

Aunque algo variables, también se observaron algunos cambios en los monocitos, basófilos y eosinófilos. Los monocitos y basófilos generalmente se redujeron a 1 mg/kg/dosis CDD o a 0,5 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin, y en perros individuales a 0,25 y 0,5 mg/kg/dosis CDD. En algunos perros, este efecto se mantuvo al final del estudio; sin embargo, hubo varios perros en los que se observó un efecto rebote con un marcado aumento en el recuento de monocitos los días 12 y 13. Los datos de los eosinófilos fueron muy variables en las hembras, pero en general se observó una reducción dependiente de la dosis en los recuentos de eosinófilos en los machos durante la segunda mitad del estudio. También se observó una reducción de los niveles en suero de potasio, calcio y fósforo en la mayoría de los perros a los que se les administraron dosis de 0,5 y 1 mg/kg/dosis.

Los hallazgos microscópicos relacionados con el compuesto A estuvieron presentes principalmente con 0,5 y 1 mg/kg/dosis. Los hallazgos microscópicos relacionados con el compuesto A generalmente se produjeron en más

tejidos o fueron más fuertes en machos que en hembras. A una dosis de 1 mg/kg CDD o de 0,5 mg/kg siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin, los hallazgos estaban presentes en el tubo GI (hemorragia y/o ulceración de la mucosa en el estómago/íleon e inflamación subaguda en el ciego), médula ósea (disminución de la hematopoyesis), y/o cambios hemorrágicos representados en una variedad de tejidos (colon, ganglio linfático mandibular, mesentérico, cervical, inguinal y/o poplíteo, epidídimo, hígado, testículos, timo y piel escrotal, mediastino peritímico y/o glándula mamaria [piel]). Un macho que recibió una dosis de 0,5 mg/kg CDD mostró signos de hemorragia en los ganglios linfáticos mandibulares y mesentéricos. Los hallazgos considerados secundarios al estrés general y/o a la anorexia se observaron a una dosis de 1 mg/kg CDD o de 0,5 mg/kg siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin tratamiento, incluyendo atrofia hepatocelular, atrofia de las células acinares pancreáticas y agotamiento linfocitario cortical tímico (que también se observó a una dosis de 0,5 mg/kg CDD).

La exposición (ABC_{0-24} y C_{\max}) aumentó proporcionalmente a la dosis de 0,25 a 1 mg/kg/dosis el día 1 y el día 12. Las exposiciones fueron comparables entre machos y hembras y no se observaron diferencias de sexo consistentes en los parámetros TC. Después de repetir la dosificación, no se observó acumulación cuando se utilizó la pauta de CDD, mientras que se observó una acumulación de aproximadamente 2 a 3 veces después de la pauta de UVD X 5. En general, no hubo efectos relacionados con el Compuesto A en perros a una dosis de 0,25 mg/kg CDD. Los hallazgos principales fueron trombocitopenia marcada y hemorragia aguda en los ganglios linfáticos mesentéricos y mandibulares a una dosis de 0,5 mg/kg CDD. A una dosis de 1 mg/kg CDD, los hallazgos generalmente consistieron en trombocitopenia marcada, una ligera reducción en los parámetros de GR, alteraciones en los niveles de monocitos y basófilos, y hallazgos microscópicos que incluían hemorragia y/o ulceración de la mucosa en el tubo GI, disminución de la hematopoyesis en la médula ósea y cambios hemorrágicos en muchos tejidos (colon, ganglio linfático mandibular, mesentérico, cervical, inguinal y/o poplíteo, epidídimo y testículos, hígado, timo, piel escrotal, mediastino peritímico y/o glándula mamaria [piel]). A una dosis de 0,5 mg/kg/dosis siguiendo la pauta de 5 días con/2 días sin tratamiento, los hallazgos incluyeron los descritos a una dosis de 1 mg/kg CDD además de la pérdida de peso de los individuos y el sacrificio moribundo de una hembra el día 12.

VII. Preparación de formas farmacéuticas de dosificación

Ejemplo 1: Cápsula oral

Las cápsulas del compuesto A están disponibles en concentraciones y tamaños de cápsula adecuados, que contienen únicamente el principio farmacéutico activo en cápsulas opacas de cubierta dura. No se utilizan excipientes en las cápsulas.

VIII. Métodos para el tratamiento de tumores sólidos recidivantes y/o resistentes (incluidos carcinomas neuroendocrinos (CNE)) y linfomas no hodgkinianos (LNH)

Ejemplo 1: Administración a los pacientes

El estudio del Compuesto A-ST-001 es un estudio clínico abierto, de Fase 1, de primera administración en seres humanos (*First-In-Human, FIH*), de ampliación y aumento de la dosis del Compuesto A en sujetos con tumores sólidos recidivantes y/o resistentes (enriquecidos para CNE) y linfomas no hodgkinianos (LNH). La parte de aumento de la dosis (Parte A) del estudio explorará el aumento de dosis orales del Compuesto A para estimar la DTM del Compuesto A. Un modelo de regresión logística bayesiana (MRLB) que utiliza aumento escalonado con control de la sobredosis (AECCS) ayudará en la orientación en cuanto a la toma de decisiones del aumento escalonado de la dosis del Compuesto A, tomando las decisiones finales un comité de revisión de seguridad (CRS). La parte de ampliación (Parte B) evaluará más a fondo la seguridad y eficacia del Compuesto A administrado a, o por debajo de, la DTM en cohortes de ampliación seleccionadas de aproximadamente 20 sujetos evaluables cada una, con el fin de definir también la DRF2. Se pueden seleccionar una o más pautas posológicas y/o subconjuntos de enfermedades para la ampliación de las cohortes (Parte B).

Las partes A y B constarán de 3 periodos: Exploración, Tratamiento y Seguimiento. *Periodo de exploración*

El período de exploración comienza 28 días (± 3 días) antes de la primera dosis del Compuesto A. El sujeto y el personal administrativo deben firmar y fechar el Documento de Consentimiento Informado (DCI) antes del inicio de cualquier otro procedimiento del estudio. Todas las pruebas y procedimientos de exploración deben finalizar en los 28 días (± 3 días) anteriores a la primera dosis del Compuesto A.

Periodo de tratamiento

Durante el período de tratamiento, el Compuesto A puede administrarse inicialmente por vía oral una vez a la semana en cada ciclo de 4 semanas (28 días). El compuesto A se puede administrar una vez a la semana por la mañana con el estómago vacío (es decir, ≥ 1 hora antes del desayuno) con al menos 240 ml de agua después de un ayuno nocturno que dure ≥ 6 horas tanto en la Parte A como en la B.

Período de seguimiento

En el período de seguimiento, se realizará un seguimiento de los sujetos durante 28 días (\pm 3 días) después de la última dosis del compuesto de prueba o composición farmacéutica por seguridad. Tras la visita de seguimiento de seguridad, se realizará un seguimiento de todos los sujetos cada 3 meses posteriores (\pm 2 semanas) para el seguimiento de la supervivencia hasta los 2 años o hasta la muerte, pérdida de contacto durante el seguimiento o el final del ensayo, lo que se produzca primero.

Criterios del sujeto

Los sujetos deben cumplir los siguientes criterios para inscribirse en el estudio:

1. El sujeto es un hombre o mujer \geq 18 años, en el momento de la firma del documento de consentimiento informado (DCI).
2. El sujeto debe comprender y firmar voluntariamente un DCI antes de realizarse cualquier evaluación/procedimiento relacionado con el estudio.
3. El sujeto está dispuesto y es capaz de cumplir el programa de visitas del estudio y otros requisitos del protocolo.
4. Sujetos con confirmación histológica o citológica de tumores sólidos avanzados irresecables (incluido el cáncer de pulmón microcítico (CPM) y otros carcinomas neuroendocrinos (CNE)) o linfomas no hodgkinianos (LNH) (linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y linfomas no hodgkinianos indolentes (LNHi)).
- Características patológicas apropiadas según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)
- Expresión de marcadores neuroendocrinos (p. ej., sinaptofisina o cromogranina A)
- Péptido liberador de progastrina (PLProG) sérico o cromogranina A (CgA) por encima del intervalo normal o calcitonina elevada para sujetos con carcinoma medular de tiroides (CMT) o pancreastatina elevada para sujetos con CNE de páncreas o de intestino delgado.

Los criterios adicionales específicos para ciertos tipos de tumores NEC son los siguientes:

Cáncer de pulmón microcítico (CPM);

- Confirmación histológica o citológica de CPM según la clasificación de la OMS de 2015; o
- Inmunohistoquímica sugestiva de CPM, tal como tinción citoplasmática positiva para AE1/AE3, positividad de NCAM (CD56), positividad de cromogranina, positividad de sinaptofisina, positividad de TTF 1 y alta actividad de proliferación demostrada por Ki-67 en casos inciertos. Se permite CPM combinado.

Carcinoma neuroendocrino macrocítico (CNEM);

- Confirmación histológica de CNEM según la clasificación de la OMS de 2015
- Inmunohistoquímica $> 10\%$ de células tumorales positivas para CD56, cromogranina o sinaptofisina. Se permite CNEM combinado.

Variante neuroendocrina del cáncer de pulmón mutante EGFR;

- Mutación de EGFR conocida
- Progresión durante/después del inhibidor previo del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
- Confirmación histológica o citológica de CPM según la clasificación de la OMS de 2015
- Inmunohistoquímica sugestiva de CPM, tal como tinción citoplasmática positiva para AE1/AE3, positividad de NCAM (CD56), positividad de cromogranina, positividad de sinaptofisina, positividad de TTF 1 y alta actividad de proliferación demostrada por Ki-67 en casos inciertos.
- Los sujetos con adenocarcinoma neuroendocrino mixto (ADCNEM), que tiene al menos un 30% de adenocarcinoma y un 30% de NEC, son admisibles si el PLProG o la CgA en suero está por encima del intervalo normal.

Carcinoma medular de tiroides (CMT);

- Diagnóstico citológico o histológico previamente confirmado de irresecable, CTM localmente avanzado o metastásico hereditario o esporádico
- Inmunohistoquímica sugestiva de CMT, incluida tinción positiva para calcitonina
- Progresión documentada de la enfermedad después de un tratamiento previo con vandetanib y/o cabozantinib
- Las lesiones calificadas al inicio del estudio no deben usarse como lesión diana al inicio del estudio a menos que no haya otras lesiones disponibles.
- Niveles de calcitonina por encima del intervalo normal

Cáncer de Próstata Neuroendocrino (CPNE);

- Cáncer de próstata metastásico y al menos uno de los diagnósticos histológicos de cáncer de próstata

microcítico o neuroendocrino, confirmado mediante inmunoquímica.

- Diagnóstico histológico de adenocarcinoma de próstata y tinción IHQ > 50 % para marcadores neuroendocrinos (cromogranina, sinaptofisina, CD56 o enolasa neuronal específica (ENS))
- Desarrollo de metástasis hepáticas en ausencia de progresión del antígeno prostático específico (PSA) según lo definido por PCWG3
- Los pacientes con prueba histológica de carcinoma neuroendocrino puro o microcítico no necesitan haber recibido previamente terapia de privación de andrógenos o niveles de castración de testosterona, pero su estado de testosterona debe mantenerse durante el estudio. Otros sujetos deben haber sido sometidos a castración quirúrgica o médica en curso y tener niveles iniciales de testosterona sérica <50 ng/dl o <1,73 nmol/l.

Carcinoma Pancreático Neuroendocrino;

- Diagnóstico patológico de carcinoma pancreático neuroendocrino (Clasificación Klimstra OMS 2010), con inmunoquímica de refuerzo
- Pruebas de evolución de la enfermedad radiológica \leq 12 meses antes del Ciclo 1, Día 1
- Sin terapia con radiomarcadores dirigida a receptores <3 meses antes del ciclo 1, Día 1
- Sin terapia dirigida al hígado <4 semanas antes del ciclo 1, Día 1
- Los sujetos con adenocarcinoma mixto son elegibles si los niveles de PLProG o CgA o pancreastatina en suero están por encima del intervalo normal.

Carcinoma hepatocelular neuroendocrino (CHCN)

- CHCN confirmado histológica o citológicamente, con inmunoquímica de refuerzo
- Recuento de plaquetas $\geq 75 \times 10^9/l$ ($\geq 75.000/mm^3$) si el sujeto tiene hipertensión portal, en caso contrario $\geq 100 \times 10^9/l$ ($\geq 100.000/mm^3$)
- Puntuación de Child-Pugh <7 (es decir, función hepática de clase A)
- BCLC C Enfermedad en estadio avanzado
- Al menos 4 semanas desde la última dosis de interferón α y/o ribavirina
- Al menos 4 semanas desde la inyección percutánea previa de etanol, ablación mediante radiofrecuencia, embolización transarterial o crioterapia con documentación de enfermedad progresiva o recurrente.
- Enfermedad medible según RECIST 1.1 fuera del hígado o enfermedad medible según RECIST 1.1 en tomografía computarizada (TC) hepática con contraste de triple fase o imágenes por resonancia magnética (IRM) que sea adecuado para repetir la medición y muestre realce arterial intratumoral. Las lesiones mal delimitadas o que muestran realce atípico en el hígado deben registrarse como lesiones no diana.
- Sin trasplante de hígado previo.
- Sin sangrado gastrointestinal o variceal en los 3 meses anteriores que requiera transfusión o intervención endoscópica u operativa.
- Sin antecedentes ni encefalopatía actual.
- Sin ascitis actual clínicamente significativa (es decir, que no se controle fácilmente con diuréticos).

Pueden inscribirse pacientes con CNE, como el carcinoma de células de Merkel, el cáncer colorrectal neuroendocrino y el melanoma neuroendocrino. Además, los pacientes con NEN G2 (recuento mitótico de 2-20 por 10 campos de gran aumento [HPF] y/o un índice Ki67 de 3-20 %) pueden inscribirse si han documentado una progresión durante o después de un tratamiento previo con un análogo de la somatostatina y un inhibidor de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR). Sin embargo, la patología y la inmunoquímica deben confirmar el elemento neuroendocrino y el diagnóstico patológico y los sujetos deben tener un péptido liberador de progastrina (PLProG) o cromogranina A (CgA) en suero por encima del intervalo normal.

5. Los sujetos deben haber progresado (o no haber podido tolerar debido a comorbilidades médicas o toxicidad inaceptable), o haber seguido una terapia estándar contra el cáncer o para los que no exista o no sea aceptable ninguna otra terapia convencional aprobada.

6. Sujeto con tumor sólido que tiene al menos un sitio de enfermedad medible según RECIST 1.1, el sujeto con LNH tiene al menos un sitio de enfermedad medible según los criterios del GIT y el sujeto con carcinoma hepatocelular neuroendocrino (CHNE) tiene al menos un sitio de enfermedad medible según mRECIST.

7. El sujeto da su consentimiento para las biopsias de tumores obligatorias (exploración y tratamiento) en la Parte B. Las biopsias de tumores, siempre que sea seguro y factible, se recogerán en la Parte A.

8. El sujeto tiene un estado funcional del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este (ECOG) de 0 a 1.

9. Los sujetos deben tener los siguientes valores de laboratorio:

- Cifra Absoluta de Neutrófilos (CAN) $\geq 1,5 \times 10^9/l$ sin ayuda del factor de crecimiento durante 7 días (14 días si el sujeto recibió pegfilgrastim).

- Hemoglobina (Hgb) ≥ 10 g/dl (≥ 100 g/l o $> 6,2$ mmol/l).
 - Recuento de plaquetas (pla) $\geq 100 \times 10^9/l$ ($\geq 50 \times 10^9/l$ para sujetos con LNH) o $\geq 75 \times 10^9/l$ para sujetos con CHCN con hipertensión portal sin transfusión durante 7 días.
 - Concentración de potasio en suero dentro del intervalo normal o corregible con suplementos.
 - 5 - Aspartato aminotransferasa sérica (SGOT) AST/SGOT y alanina aminotransferasa (SGPT) ALT/SGPT $\leq 3,0 \times$ límite superior de la normalidad (LSN) o $\leq 5,0 \times$ LSN si hay metástasis hepáticas.
 - Bilirrubina total sérica $\leq 1,5 \times$ LTLN.
 - Los sujetos deben tener albúmina sérica $\geq 3,5$ g/dl
- 10 La función hepática adecuada para sujetos con carcinoma hepatocelular (CHC) incluye:
- AST y ALT séricos $\leq 5 \times$ LSN
 - Bilirrubina total sérica ≤ 3 mg/dl (≤ 51 μ mol/l)
 - Seroalbúmina $\geq 3,0$ g/dl
 - 15 - Creatinina sérica $\leq 1,5 \times$ LSN, o aclaramiento de creatinina ≥ 50 ml/min/1,73 m² medido utilizando un marcador de filtración exógeno tal como iohexol, inulina, ⁵¹Cr EDTA o ¹²⁵I iotalamato.
 - Tiempo de protrombina (TP) (o índice internacional normalizado (IIN) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) dentro del intervalo normal.
- 20 10. Las mujeres en edad fértil (MEF) deben:
- O bien comprometerse a una verdadera abstinencia de contactos heterosexuales (que debe revisarse mensualmente y documentarse en la fuente) o bien aceptar el uso y ser capaz de cumplir con, al menos dos métodos anticonceptivos eficaces (anticonceptivos hormonales orales, inyectables o implantables; ligadura de trompas; dispositivo intrauterino; anticonceptivo de barrera con espermicida; o pareja vasectomizada), uno de los
 - 25 - cuales debe ser de barrera, desde la firma del DCI, durante todo el estudio y hasta 90 días después de la última dosis del compuesto o composición farmacéutica de prueba; y tener dos pruebas de embarazo con resultado negativo según lo verificado por el investigador antes de comenzar con el compuesto o la composición farmacéutica de prueba:
 - 30 - una prueba de embarazo en suero con resultado negativo (sensibilidad de al menos 25 mIU/ml) en la exploración
 - una prueba de embarazo en suero u orina con resultado negativo en las 72 horas anteriores al Día 1 del Ciclo 1 del tratamiento del estudio.
 - Evitar concebir durante los 90 días posteriores a la última dosis del compuesto o composición farmacéutica de prueba.
 - 35 - Acceder a someterse a pruebas de embarazo continuas a lo largo del estudio y después de finalizar el tratamiento del estudio. Esto se aplica incluso si el sujeto practica una verdadera abstinencia de contacto heterosexual.
11. Los hombres deben practicar una verdadera abstinencia (que debe revisarse mensualmente) o aceptar el uso de un condón (se recomienda un condón de látex) durante el contacto sexual con una mujer embarazada o una MEF y
- 40 evitarán la concepción a partir de la firma del DCI, mientras participa en el estudio, durante las interrupciones de dosis, y durante al menos 90 días después de la interrupción de la administración del compuesto o composición farmacéutica de prueba, incluso si se ha sometido a una vasectomía con éxito
- Criterios de exclusión:
- 45 La presencia de cualquiera de los siguientes criterios excluirá a un sujeto de la inscripción:
1. Se excluyen los tumores neuroendocrinos de bajo grado (G1) (≤ 2 por campos de gran aumento (HPF) y/o ≤ 2 % de índice Ki67), como los carcinoides.
 - 50 2. El sujeto ha recibido terapia contra el cáncer (ya sea aprobada o en investigación) en el transcurso de ≤ 4 semanas o 5 semividas, lo que sea más corto, antes de firmar el DCI.
 - < 42 días para nitrosureas o mitomicina C previas
 - 55 3. Las toxicidades resultantes de terapias previas contra el cáncer sistémico deben haberse resuelto según los Criterios de Terminología Común para Acontecimientos Adversos (CTCAE) de \leq Grado 1 del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) antes de comenzar el tratamiento con el compuesto o la composición farmacéutica de prueba (con excepción de neuropatía periférica y alopecia de grado 2).
 4. ASCT previo ≤ 3 meses antes de la primera dosis o aquellos que no se hayan recuperado.
 - 60 5. Trasplante alogénico previo de células madre con acondicionamiento estándar o de intensidad reducida.
 6. El sujeto se ha sometido a cirugía mayor < 4 semanas o cirugía menor < 2 semanas antes de firmar el DCI o que no se ha recuperado de la cirugía.
 7. El sujeto ha finalizado cualquier tratamiento de radiación < 4 semanas antes de firmar el DCI o < 2 semanas para radioterapia ósea paliativa (fracción única). Los sujetos con > 25 % de radiación mielopoyética en la MO no pueden
 - 65 8. El sujeto tiene diarrea persistente debido a un síndrome de malabsorción (tal como celiaquía o enfermedad

inflamatoria intestinal) \geq Grado 2 según el CTCAE del NCI, a pesar del tratamiento médico), o cualquier otro trastorno GI significativo que pudiera afectar a la absorción del compuesto o de la composición farmacéutica de prueba.

9. Sujetos con úlceras sintomáticas o no controladas (gástricas o duodenales), particularmente aquellos con antecedentes y/o riesgo de perforación y hemorragias del tubo GI.

10. Sujetos con cualquier acontecimiento de hemorragia/sangrado $>$ Grado 2 según el CTCAE o hemoptisis $>$ 1 cucharadita en las 4 semanas previas a la primera dosis

11. Metástasis sintomáticas, no tratadas o inestables en el sistema nervioso central (SNC).

- El sujeto tratado recientemente con radiación cerebral total o radiocirugía estereotáxica para metástasis del SNC debe haber finalizado la terapia al menos 4 semanas antes del Ciclo 1, Día 1 y tener una TC o RMN de seguimiento que demuestre metástasis estables o mejoría de las metástasis 4 semanas o más después de finalizar la radioterapia (esta última se obtendrá como parte de las evaluaciones de exploración).

- El sujeto debe estar asintomático y sin esteroides o con una dosis estable de esteroides durante al menos 4 semanas (≤ 10 mg/día de prednisona equivalente)

12. Sujeto con CPM que tiene antecedentes de enfermedad pulmonar intersticial (EPI) O antecedentes de neumonitis que ha necesitado esteroides orales o intravenosos (IV)

13. El sujeto tiene pancreatitis aguda o crónica sintomática conocida.

14. El sujeto tiene una función cardíaca deteriorada o enfermedades cardíacas clínicamente significativas, incluidas cualquiera de las siguientes:

- Fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI) $<$ 45 % determinada mediante ventriculografía nuclear (MUGA, *multiple gated acquisition scan*) o ecocardiograma (ECG).

- Bloqueo completo de rama izquierda o bifascicular.

- Síndrome del intervalo QT largo congénito.

- Arritmias ventriculares persistentes o clínicamente significativas, o fibrilación auricular.

- QTcF ≥ 480 ms en ECG de exploración (media de registros por triplicado).

- Angina de pecho inestable o infarto de miocardio ≤ 6 meses antes de comenzar con el Compuesto A.

15. El sujeto padece otra cardiopatía clínicamente significativa, tal como insuficiencia cardíaca congestiva que requiere tratamiento o hipertensión no controlada (presión arterial $\geq 160/95$ mm Hg).

16. El sujeto es una mujer embarazada o en periodo de lactancia.

17. El sujeto tiene infección conocida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

18. El sujeto tiene una infección activa crónica conocida por el virus de la hepatitis B o C (VHB, VHC).

- Son elegibles los sujetos seropositivos debido a la vacunación contra el VHB.

- Son elegibles los sujetos que no tengan infección vírica activa y estén con profilaxis adecuada contra la reactivación del VHB.

- Los sujetos con CHC están exentos de los criterios anteriores

19. Sujeto con tratamiento en curso con dosis terapéuticas crónicas de anticoagulantes (p. ej., warfarina, heparina de bajo peso molecular, inhibidores del Factor Xa, antagonista de trombina). Se permiten dosis bajas de heparina de bajo peso molecular para el mantenimiento del catéter y para la profilaxis de corta duración de sujetos con EP y TVP previas, bajo la atenta consideración del investigador.

20. El sujeto tiene antecedentes de segundos cánceres concurrentes que requieren tratamiento sistémico activo y continuo.

21. El sujeto padece alguna afección médica significativa (p. ej., infección o enfermedad renal activa o no controlada), anomalía de laboratorio o dolencia psiquiátrica que impediría al sujeto participar (o comprometería su cumplimiento) en el estudio o le expondría a un riesgo inaceptable si participara en el estudio.

22. El sujeto padece alguna afección que dificulte la interpretación de los datos del estudio.

Parte A -Aumento escalonado de la dosis

Se incluye un mínimo de 3 sujetos en cada nivel de dosis. La dosis inicial del Compuesto A será de 1,25 mg una vez por semana. El MRLB con AECCS incorporará información de seguridad previa disponible y actualizará los parámetros del modelo después de que cada nueva cohorte de sujetos complete el Ciclo 1. La decisión sobre la siguiente dosis la toma el SRC en función de un cálculo de la evaluación de riesgos utilizando el MRLB y la información disponible sobre seguridad (es decir, datos de seguridad con TLD y sin TLD), FC, FD y eficacia. Además, en la evaluación pueden utilizarse datos no clínicos pertinentes (por ejemplo, estudios de toxicidad BPL (buenas prácticas de laboratorio), farmacología *in vivo* a partir de modelos de xenoinjerto, etc.). Los detalles de la metodología estadística se proporcionan en el Anexo E.

En todos los momentos de decisión, el MRLB permite alteraciones en los incrementos de dosis en función de las TLD observadas; sin embargo, la dosis para la siguiente cohorte no superará un aumento del 100 % con respecto a la dosis anterior. La DTM es la dosis más alta para la cual menos del 33 % de la población (sin muestra de la población) tratada

con el Compuesto A sufre una DLT en el primer ciclo con al menos 6 sujetos evaluables que hayan sido tratados a esta dosis. El CRS toma la decisión final con respecto a la dosis del Compuesto A para cada cohorte.

Durante el aumento escalonado de la dosis, una dosis del Compuesto A puede determinarse como la DMT tras cumplir las siguientes condiciones:

- se han tratado al menos 6 sujetos evaluables con la dosis,
- la probabilidad posterior de que la tasa de TLD que se encuentra en el intervalo diana (16-33 %) a la dosis supere el 60 % o que se haya incluido en el estudio un número suficiente de sujetos para garantizar la precisión de la estimación de la DTM, a medida que la probabilidad posterior se acerca pero no supera el 60 %, y
- la dosis se recomienda según el MRLB y está aprobada por el CRS.

El CRS puede suspender el aumento escalonado de la dosis en cualquier momento basándose en aspectos nuevos relacionados con la seguridad sin establecer la DTM. El CRS incluye investigadores (y/o representantes designados), el médico del estudio del laboratorio promotor, médico de seguridad, estadístico del estudio y director del estudio. Los asistentes especiales pueden incluir al farmacocinético del estudio, al científico del biomarcador del estudio y al científico clínico del estudio. El CRS puede consultar a otros expertos internos y externos, según sea necesario.

Todas las decisiones tomadas en las reuniones del CRS se documentarán formalmente (a través de las actas de la reunión del CRS) y se distribuirán por escrito a todos los centros. No se iniciará ningún aumento escalonado de la dosis, desescalada, cambio en la pauta de dosificación o ampliación de las cohortes de dosis existentes, antes de que se envíe una notificación por escrito a todos los centros participantes de la decisión respectiva del CRS.

La decisión de evaluar sujetos adicionales dentro de una cohorte de dosis, una cohorte de dosis más alta, cohortes de dosis intermedias, incrementos de dosis más pequeños, esquemas de dosificación alternativos (por ejemplo, una vez cada dos semanas), o declarar una DMT también será determinada por el CRS, basándose en la evaluación MRLB y en su revisión de la seguridad disponible (es decir, datos DLT y no DLT), en la FC, FD y en información preliminar sobre eficacia. La decisión final la tomará el CRS.

Después de administrar la primera dosis en cualquier cohorte durante el aumento escalonado de la dosis, se observan los sujetos de cada cohorte durante 28 días (Ciclo 1, intervalo de TLD) antes de que pueda comenzar la siguiente cohorte de dosis. No se incluirá más de un sujeto al día en una cohorte de aumento escalonado de la dosis determinada. Un sujeto evaluable para TLD se define como uno que:

- Ha recibido ≥ 75 % de la dosis total planificada del Compuesto A durante el Ciclo 1 sin experimentar una TLD, o
- ha experimentado una TLD tras recibir al menos una dosis del Compuesto A.

Se sustituirán los sujetos no evaluables para TLD.

Durante los niveles de dosis iniciales, los sujetos con tumores sólidos y LNH recidivantes y resistentes se inscribirán hasta la 2ª aparición de una toxicidad de Grado ≥ 2 relacionada con el fármaco del estudio en el Ciclo 1. Después, la inscripción se restringirá a sujetos con cáncer de pulmón microcítico (CPM) y otros carcinomas neuroendocrinos (CNE) que secretan péptido liberador de progastrina (PLProG) o cromogranina A (CgA) o pancreastatina (en CNE pancreáticos y del intestino delgado) o calcitonina (en carcinoma medular de tiroides (CMT)).

No se permitirá el aumento escalonado de la dosis intrasujeto durante el período de evaluación de la TLD; sin embargo, en los Ciclos ≥ 3 , los sujetos sin pruebas de evolución de la enfermedad que estén tolerando su dosis asignada del Compuesto A pueden (a criterio del investigador y consultando al médico del estudio del laboratorio promotor) aumentar escalonadamente el nivel de dosis más alto que se haya demostrado que es tolerado adecuadamente por al menos una cohorte de sujetos en este estudio (es decir, si el riesgo de sobredosis es inferior al 25 % en función de la evaluación del MRLB).

Parte B Ampliación de la cohorte

Una vez completado el aumento escalonado de la dosis (Parte A), las cohortes tumorales seleccionadas se incluyen en una fase de ampliación (Parte B) con aproximadamente 20 sujetos evaluables cada una. La ampliación puede producirse a la DMT y siguiendo la pauta establecida en la fase de aumento escalonado de la dosis, y/o a una dosis y pauta tolerables alternativas, basándose en la revisión de los datos disponibles de seguridad, FC, FD y de eficacia de la Parte A. El CRS seleccionará las dosis y pautas de interés para la ampliación de la cohorte. Se pueden seleccionar una o más pautas posológicas para la ampliación de la cohorte. El CRS continuará revisando los datos de seguridad regularmente a lo largo del estudio y hará recomendaciones sobre la continuación del estudio y la modificación de la dosis, según sea adecuado.

El estudio se llevará a cabo de conformidad con la Conferencia Internacional de Armonización (ICH)/Buenas Prácticas

Clínicas (BPL).

Población del estudio

- 5 En el estudio participarán hombres y mujeres de 18 años o mayores, con tumores sólidos recidivantes y/o resistentes (enriquecidos para CNE) y LNH (LDCBG y LNH_i).

Duración del estudio

- 10 Se espera que la inclusión tarde aproximadamente 30 meses en completarse (de 12 a 18 meses para el aumento escalonado de la dosis y de 9 a 12 meses para la ampliación). Se espera que la finalización del tratamiento activo y el seguimiento posterior al tratamiento duren de 4 a 28 meses más. Se espera que todo el estudio dure aproximadamente 5 años.
- 15 El final del ensayo se define como la fecha de la última visita del último sujeto para completar el seguimiento posterior al tratamiento, o la fecha de recepción del último punto de datos del último sujeto que se requiere para el análisis primario, secundario y/o explorador, como se especifica previamente en el protocolo, cualquiera que sea la fecha posterior.

Tratamientos del estudio

- Celgene Corporation (Celgene) suministrará el producto en investigación, cápsulas con Compuesto A (que contienen únicamente el principio farmacéutico activo a concentraciones de dosis de 0,50 mg, 0,75 mg y 2,00 mg) para administración oral, etiquetadas adecuadamente para su uso en investigación según la normativa de la autoridad sanitaria del país correspondiente.
- 25

El tratamiento del estudio puede suspenderse si hay pruebas de evolución clínicamente significativas de la enfermedad, toxicidad inaceptable o decisión del médico/sujeto de abandonar el estudio.

Visión general de las evaluaciones de eficacia clave

- Se evaluará la eficacia de los sujetos cada 2 ciclos hasta el ciclo 6 y, a partir de entonces, cada 3 ciclos. Todos los sujetos que interrumpan el tratamiento por razones distintas a la progresión de la enfermedad, el inicio de una nueva terapia contra el cáncer o la retirada del consentimiento de todo el estudio recibirán un seguimiento hasta la progresión y/o el inicio de nuevas terapias sistémicas contra el cáncer.
- 35

- La respuesta del tumor será determinada por el investigador. Para los tumores sólidos, la evaluación se basará en los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST 1.1) (Eisenhauer, 2009). Para los LNH, la evaluación se basará en los criterios de respuesta revisados por el grupo de trabajo internacional para el linfoma maligno. Se requiere una tomografía de emisión de positrones (TEP) con [18F] fluorodesoxiglucosa (FDG) o la formación de imágenes por TEP/TAC con FDG para confirmar una respuesta completa en sujetos con tumores con avidéz por FDG. Para el carcinoma de próstata neuroendocrino (CPNE), la evaluación de la respuesta se basará en los criterios del PCWG3. Para el carcinoma hepatocelular neuroendocrino (CHNE), la respuesta se basará en los criterios mRECIST. En los carcinomas neuroendocrinos se evaluarán además los niveles de marcadores neuroendocrinos al inicio y durante el estudio.
- 40
- 45

Visión general de las evaluaciones de seguridad clave

- Las variables de seguridad para este estudio incluyen acontecimientos adversos, variables de laboratorio clínico de seguridad, electrocardiogramas de 12 derivaciones, estado funcional del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este, evaluaciones de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo, exploraciones físicas, constantes vitales, exposición al tratamiento del estudio, evaluación de medicamentos concomitantes y pruebas de embarazo para mujeres en edad fértil. Los perfiles FC del Compuesto A se determinan a partir de muestras de sangre en serie.
- 50

Visión general de las evaluaciones farmacocinéticas clave

- Los parámetros FC plasmáticos determinados para el Compuesto A serán la concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) observada, el área bajo la curva (ABC) de tiempo frente a concentración plasmática, el tiempo hasta la concentración plasmática máxima ($T_{\text{máx}}$) observada, la semivida terminal ($t_{1/2}$), el aclaramiento aparente (CL/F) y el volumen de distribución aparente (V_z/F). Se pueden realizar análisis de respuesta a la exposición, según sea apropiado, para ayudar en la identificación del régimen de dosificación para los estudios de la Parte B o de la Fase 2.
- 60

Métodos estadísticos

- Los objetivos principales de este estudio son evaluar la seguridad y tolerabilidad del tratamiento con el Compuesto A, incluyendo la determinación de la DMT. El método de análisis para estimar la DMT es el MRLB guiado por el principio
- 65

de AECCS.

Los análisis estadísticos se realizan por nivel de dosis (Parte A) y cohorte de tumor (Parte B) según sea necesario o aplicable. Todos los análisis serán de naturaleza descriptiva. Los resúmenes de los datos de seguridad se llevarán a cabo con sujetos que reciban cualquier Compuesto A (la Población tratada).

Los datos del estudio se resumirán en cuanto a disposición, características demográficas y basales, exposición, eficacia, seguridad, FC y FC. Los datos categóricos se resumirán mediante distribuciones de frecuencia (número y porcentajes de sujetos) y los datos continuos se resumirán mediante estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, mediana, mínima y máxima).

Los acontecimientos adversos que se presentan con el tratamiento (AAT) se resumirán según los criterios de terminología comunes del Instituto Nacional del Cáncer para los grados de acontecimientos adversos. La frecuencia de los AAT se tabulará por categoría de órgano, aparato o sistema) y término preferente del Diccionario Médico para actividades de Registro Farmacéutico. Los AAT de Grado 3 o 4, los AAT que conducen a la suspensión del Compuesto A, los AAT relacionados con el fármaco del estudio y los AAG, se tabularán por separado. Se resumirán los cambios desde el inicio en análisis de laboratorio seleccionados, constantes vitales, ECG de 12 derivaciones y exploraciones ECO/MUGA. Todos los datos se presentarán en listados por sujeto.

La principal variable de eficacia de la Parte A es la tasa de beneficio clínico (TBC). La TBC se define como las respuestas tumorales (según la evaluación de los investigadores) de la respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP) y enfermedad estable (EE) duradera (EE de ≥ 4 meses de duración). Se comunicarán estimaciones puntuales e intervalos de confianza del 95 % de la TBC. La tasa de respuesta objetiva (definida como el porcentaje de sujetos cuya mejor respuesta es una respuesta completa o una respuesta parcial), la duración de la respuesta/enfermedad estable, el tiempo hasta la progresión, la supervivencia sin progresión y la supervivencia global, se resumirán mediante tabulaciones de frecuencia para variables categóricas o estadísticas descriptivas para variables de tiempo hasta el acontecimiento. El análisis de eficacia se repetirá para la población tratada y la población evaluable de eficacia (sujetos que recibieron una evaluación inicial de la valoración de la enfermedad, al menos un 75 % de las dosis asignadas en el ciclo 1 y una en la evaluación de la valoración de enfermedad del estudio), con el resultado utilizando la población tratada considerada primaria.

Durante el aumento escalonado de la dosis de la Parte A, se inscribirán aproximadamente 50 sujetos. Durante la ampliación de la dosis de la Parte B, inicialmente se incluirán al menos 14 sujetos evaluables en cuanto a la eficacia en cada cohorte tumoral. La cohorte tumoral se ampliará a aproximadamente 20 sujetos si se observa una respuesta o una DE de 4 meses o mayor.

Objetivos del estudio

Objetivo principal

Los objetivos principales del estudio son:

- Determinar la seguridad y tolerabilidad del Compuesto A.
- Definir la dosis máxima tolerada (DMT) y/o la dosis recomendada para la Fase 2 (DRF2) del Compuesto A.

Objetivo(s) secundario(s)

Los objetivos secundarios son

- Proporcionar información sobre la eficacia preliminar del Compuesto A.
- Caracterizar la farmacocinética (FC) del Compuesto A.

Objetivo(s) exploradores(s)

Los objetivos exploradores son:

- Evaluar los efectos FD del compuesto A sobre la expresión génica en sangre periférica y, si se dispone de ellas, en muestras tumorales.
- Evaluar los efectos FD del Compuesto A sobre los niveles de neuropéptido secretado (tal como PLProG, CgA o calcitonina) en sueros de sujetos con CNE y CPM.
- Explorar la relación entre la dosis del Compuesto A, la exposición al plasma y los criterios de valoración clínicos seleccionados (p. ej., medidas de toxicidad, actividad preliminar y/o biomarcadores).

- Explorar la relación entre el inicio, durante el tratamiento y/o cambios en la expresión génica en muestras de tumores (si se dispone de ellas) y la respuesta clínica.
- Caracterizar los principales metabolitos del Compuesto A en plasma siempre que se disponga de datos suficientes.
- Los datos de los objetivos exploradores pueden incluirse en el Informe del estudio clínico según el SAP(plan de análisis estadístico).

Criterios de valoración del estudio

Criterio de valoración	Nombre	Descripción	Marco temporal
Criterios de valoración de seguridad primarios		TLD y DMT evaluados utilizando los criterios CTCAE (<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i> , criterios terminológicos comunes para acontecimientos adversos) del NCI (<i>National Cancer Institute</i> , Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU.), Versión 4.03	Aumento escalonado de la dosis
Secundario	Eficacia preliminar	Tasa de beneficio clínico (TBC) determinada por las tasas de respuesta y de enfermedad estables por criterios de respuesta apropiados para la enfermedad, TRO, DOR y PFS	Aumento gradual y ampliación de la dosis
	Supervivencia global	Desde la primera dosis hasta la muerte por cualquier causa	Aumento gradual y ampliación de la dosis
	Criterios de valoración FC	concentración en plasma máxima observada (C_{\max}), área bajo la curva (ABC) de tiempo frente a concentración plasmática, tiempo hasta la concentración plasmática máxima (T_{\max}) observada, semivida terminal ($t_{1/2}$), aclaramiento aparente (CL/F) y volumen de distribución aparente (V_z/F) del compuesto A	Aumento escalonado de la dosis
Exploratorio	Criterios de valoración FD	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión génica en componentes de células sanguíneas periféricas • Expresión génica en tejido tumoral, si se dispone del mismo • Niveles de neuropéptidos secretados (tal como PLProG, CgA, calcitonina) en sueros de sujetos con CNE y CPM 	Aumento gradual y ampliación de la dosis
	Criterios de valoración FC	<ul style="list-style-type: none"> • Covariables clínicamente relevantes de los parámetros FC • Identificación del (de los) metabolito(s) principal(es) del Compuesto A en plasma • Relaciones de exposición frente a respuesta 	

Diseño del estudio

El estudio del compuesto A-ST-001 es un estudio clínico abierto, de Fase 1a, FIH, de ampliación y aumento de la dosis del Compuesto A en sujetos con tumores sólidos recidivantes y/o resistentes (incluido CNE) y LNH. La parte de aumento de dosis (Parte A) del estudio explorará el aumento de dosis orales del Compuesto A para estimar la DTM del Compuesto A. Un modelo de regresión logística bayesiana (MRLB) que utiliza aumento escalonado con control de sobredosis (AECCS) (Babb, 1998; Neuenschwander, 2008) ayudará a guiar las decisiones de aumento de dosis del Compuesto A y las decisiones finales las tomará un CRS. La parte de ampliación (Parte B) evaluará también la seguridad y eficacia del Compuesto A administrado a, o por debajo de, la DTM en cohortes de ampliación seleccionadas de aproximadamente 20 sujetos evaluables cada una para definir también la DRF2. Se pueden seleccionar una o más pautas posológicas y/o subconjuntos de enfermedades para la ampliación de las cohortes (Parte B). Las partes A y B constarán de 3 periodos: periodo de exploración, tratamiento y seguimiento (consulte la Figura 37).

El estudio se realizará de conformidad con el consejo internacional de armonización (ICH) de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano/Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y los requisitos reglamentarios aplicables.

Duración del estudio con los sujetos

5 Se espera que la inclusión tarde aproximadamente 30 meses en completarse (de 12 a 18 meses para el aumento escalonado de la dosis y de 9 a 12 meses para la ampliación). Se espera que la finalización del tratamiento activo y el seguimiento posterior al tratamiento duren de 4 a 28 meses más. Se espera que todo el estudio dure aproximadamente 5 años.

Fin del ensayo

10 El final del ensayo se define como la fecha de la última visita del último sujeto para completar el seguimiento posterior al tratamiento, o la fecha de recepción del último punto de datos del último sujeto que se requiere para el análisis primario, secundario y/o explorador, como se especifica previamente en el protocolo, cualquiera que sea la fecha posterior.

15 En cuanto a los procedimientos, las preguntas relacionadas con el protocolo deben dirigirse al monitor médico o a la persona designada. En la Tabla 34, se describen los procedimientos realizados para cada sujeto incluido en el estudio:

Tabla 34. Tabla de acontecimientos

	Período de tratamiento												Período de seguimiento	
	Exploración	Ciclo 1				Ciclos 2-4				Ciclos 5+			FdT	Seguridad ^b
		Sem 1	D 1	D 2	D 3	Sem 2	D8	D15	D22	Sem 3	D1	Sem 4	Sem 1	Sem 3
Acontecimientos ^a	D-28 a -1	D 1	D 2	D 3	D 8	D15	D22	D1	D8	D15	D22	D1	D15	D15
Entrada en el estudio														
Consentimiento informado	X													
asesoramiento anticonceptivo	X	X						X					X	
consentimiento informado para análisis explorador opcional	X													
Criterios de inclusión/exclusión	X													
Antecedentes médicos/oncológicos y terapias	X													
Demografía	X													
Registro de TIR	X	X				Día 1 de cada Ciclo. Consulte el manual de instrucciones de TIR.								X
Medicamentos previos/concomitantes, procedimientos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fármaco de estudio														
Administrar el Compuesto A oral según la pauta de dosificación asignada ^a		Semanalmente Observación: Se pueden implementar pautas posológicas alternativas según las decisiones del CRS.												
Proporcionar/revisar la tarjeta de diario		X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Contabilizar el PI		X						X					X	
Evaluaciones de seguridad														
Evaluación de acontecimientos adversos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Altura	X								X (C2 solo)	X				
Peso	X	X			X	X	X	X	X (C2 solo)	X			X	
Constantes vitales	X	X			X	X	X	X	X (C2 solo)	X			X	

(continuación)

	Período de tratamiento														Período de seguimiento		
	Ciclo 1							Ciclos 2-4							Ciclos 5+		
	Exploración	Sem 1	D 1	D 2	D 3	D 8	D 15	D 22	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 1	Sem 3
Acontecimientos*	D-28 a -1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Exploración física	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EF ECOG	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B Evaluación de síntomas (solo UNH)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ECG de 12 derivaciones (simple o triplicado)*	X (≥72 horas antes del D1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FEVI (ECOMUGA)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Prueba de embarazo (solo MEF)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Laboratorio de hematología	X (D-14 a -1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Laboratorio de bioquímica con pruebas de LDH, ácido úrico	X (D-14 a -1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Triglicéridos y colesterol (en ayunas)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TP (o IIN), TTP	X (D-14 a -1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Amilasa, lipasa, subconjuntos de células T (CD4+ y CD8+), TSH	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis de orina	X (D-14 a -1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluación de hepatitis vírica solo para sujetos con CHC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Markadores neuroendocrinos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Markadores tumorales (para cualquier sujeto con CPNE y CHCN y otros tumores, si corresponde)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Markadores óseos	X (D-14 a -1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Evaluaciones FC y FD																	
Sangre, FC	Consulte la Tabla 14 para obtener un calendario de recogida detallado																
Sangre (entera), FD	Consulte la sección para obtener un calendario de recogida detallado																
FD sérica (solo NEC y CPM)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biopsia Tumoral*	X (predosis de D-28 a D1)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tejido tumoral de archivo (FFIP)	X*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Eficacia												
Evaluaciones de tumores sólidos/LNH: Generación de imágenes por TC/RMN ^a	X										X (D2 8 ±7d; C2 & C4)	X D28 ± 7 d en C6, a continuación cada 3 ciclos, es decir, final de C9, C12, etc.).
específico de LNH: evaluación de la médula ósea si se sabe o se sospecha que la médula ósea está afectada	X ⁱ											X, solo al confirmar RC
específico de LNH: Exploración de TEP con FDG o TEP/ECT (no se requiere si el tumor es negativo a FDG)	X										X, si confirmar RC	
Seguimiento adicional												
Terapias de seguimiento contra el cáncer												X
Seguimiento AAG												X
Seguimiento de supervivencia:												

Abreviaturas: AFP = alfa fetoproteína; anti-HBc = anticuerpo central de la hepatitis B; anti-VHC = anticuerpo de superficie de la hepatitis C; anti-HBS = anticuerpo de superficie de la hepatitis B; β -HCG = gonadotropina coriónica beta humana; C = ciclo; HC = Hemograma Completo; RC = Respuesta Completa; TC = Tomografía Computarizada; D = día(s); ECG = Electrocardiograma; ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este; MEF = Mujeres en Edad Fértil; PET con FDG = tomografía por emisión de positrones con 18-fluorodesoxiglucosa; FF-IP = fígado con fígado incluido en parafina; HBsAg: Antígeno de superficie de la hepatitis B; CHC = carcinoma hepatocelular; IN = Índice Internacional Normalizado; TRI = tecnología de respuesta interactiva; FEVI = Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo; m = meses(s); VRN = Ventriculografía Nuclear; LNH = linfoma no Hodgkiniano; FD = farmacodinámica; FO = farmacocinética; EF = estado funcional; TP = tiempo de Protrombina; HPT = Hormona paratiroidea; TTP = Tiempo de Tromboplastina Parcial; c = cada; AAG = acontecimiento adverso grave; HET = hormona estimulante de la tiroides; SEM(s) = semana(s).

a Esta evaluación de seguimiento de Seguridad podrá realizarse por teléfono (consulte la sección 6.3.1). Seguimiento de supervivencia prolongado de hasta 2 años o hasta la muerte, pérdida de contacto durante el seguimiento o el final del ensayo, lo que se produzca primero. Puede realizarse mediante revisión de registros.

b Todas las visitas/procedimientos del estudio tendrán una ventana de \pm 3 días y todas las muestras de sangre de laboratorio deben extraerse antes de la dosis, a menos que se especifique lo contrario en esta tabla o en la sección 6.

c En el ciclo 6 en adelante, solo se requiere el día 1.

d La exploración de los ECG por triplicado deben realizarse \geq 72 horas antes de la dosificación del Día 1 para que los resultados de la lectura central estén disponibles para su revisión.

e A menos que la FD haya sido documentada previamente.

f Las biopsias de tumores por pares son obligatorias para la Parte B y muy recomendables para la Parte A. La biopsia de exploración (predosis D-7 a D1) debe obtenerse después de que se hayan cumplido todos los criterios de inclusión/exclusión. La biopsia del Ciclo 1 se puede obtener el día 16 o 17 (ventana de \pm 7 días) siempre que se hayan administrado 2 dosis consecutivas del Compuesto A.

g Quiérogatorio solo si no se recoge una biopsia reciente durante la exploración.

h Todos los sujetos que interrumpen el tratamiento por razones distintas a la evolución de la enfermedad, al inicio de una nueva terapia contra el cáncer o a la retirada del consentimiento de todo el estudio, tendrán un seguimiento de acuerdo con el calendario de evaluación del tumor especificado hasta la evolución y/o el inicio de nuevas terapias sistémicas contra el cáncer.

i Puede omitirse si los resultados son normales en la biopsia de médula ósea histórica más reciente del sujeto. De manera adicional, este análisis puede omitirse si se realizó un análisis previo en el plazo de los 90 días previos al Día 1 del Ciclo 1. Los resultados históricos se registrarán en el CRDE.

j Las visitas de los días 8 y 22 podrán omitirse a partir del Ciclo 3 en adelante k Podrán omitirse si se realizaron en los 28 días anteriores.

- Todas las visitas del estudio tienen una ventana de ± 3 días a menos que se especifique lo contrario a continuación o en la Tabla de acontecimientos (véase la Tabla 34). Todas las muestras de sangre de laboratorio deben extraerse antes de la dosis, a menos que se especifique lo contrario (p. ej., muestras FC).
- Los procedimientos del estudio deben registrarse en el documento original y en los cuadernos de recogida de datos en soporte electrónico (CRDe). En caso de que los sujetos no superen la evaluación, se documentará una información mínima en los CRDe, según las instrucciones de la base de datos.
- La ventana de selección comienza 28 días (± 3 días) antes de la primera dosis del Compuesto A. Consulte la Tabla 34, de esta sección, para obtener información detallada sobre los procedimientos realizados y el calendario.
- No se concederán excepciones al protocolo durante la realización de este ensayo, bajo ninguna circunstancia.
- Los análisis de laboratorio de seguridad se realizarán localmente. Los valores de laboratorio de exploración deben demostrar la idoneidad del sujeto, pero pueden repetirse dentro de la ventana de exploración, si fuera necesario.
- El personal cualificado del estudio, entregará el DCI en la visita de exploración a todos los sujetos. Debe ser firmado y fechado por el sujeto y el personal administrativo antes del inicio de cualquier otro procedimiento de estudio y su finalización documentada en los documentos originales y en el CRDe. Todas las pruebas y los procedimientos de exploración deben finalizar en los 28 días (± 3 días) anteriores a la primera dosis del Compuesto A de acuerdo con el calendario que se muestra en la Tabla 34.
- Lo siguiente se realizará en la exploración, después de haber obtenido el consentimiento informado:
- Los criterios de inclusión y exclusión se evaluarán en la exploración y se registrarán en los documentos originales y en el CRDe.
 - Asesoramiento anticonceptivo: los profesionales sanitarios cualificados serán formados por Celgene, o su persona designada, en los requisitos específicos para el asesoramiento anticonceptivo de los sujetos. Una vez formado, este personal de atención sanitaria asesorará a los sujetos antes de la administración del Compuesto A para garantizar que el sujeto haya cumplido con todos los requisitos, incluyendo el uso de anticonceptivos, y que comprende los riesgos asociados con el Compuesto A.
 - Durante la exploración se recogerán los antecedentes médicos, oncológicos y quirúrgicos, así como los datos demográficos (incluyendo la fecha de nacimiento, sexo, raza y etnia de cada sujeto) de acuerdo con la normativa local. Los antecedentes oncológicos incluirán los antecedentes detallados del diagnóstico primario y la fecha, las terapias y respuestas.
 - Se recopilará información sobre medicamentos y procedimientos previos y concomitantes
 - Registro en el sistema de tecnología de respuesta interactiva (TRI).
 - Control de acontecimientos adversos.
 - Medición de la altura y del peso.
 - Evaluación de las constantes vitales.
 - Exploración física (fuente documentada únicamente) y estado funcional del ECOG.
- Para sujetos con LNH, las mediciones de los ganglios linfáticos y la documentación de cualquier agrandamiento del bazo y/o del hígado, se registrarán en el documento original y en el CRDe.
- La evaluación de los síntomas B (solo sujetos con LNH): Los síntomas B son fiebre ($> 100,5$ °F o 38 °C) durante 2 o más semanas sin otra evidencia de infección, sudores nocturnos durante más de 1 mes sin evidencia de infección y pérdida de peso superior al 10 % en los 6 meses anteriores.
 - Se realizará un ECG de 12 derivaciones por triplicado ≥ 72 horas antes de la primera dosis del Compuesto A, recibiendo y evaluándose los resultados desde la lectura central antes de la dosificación para cumplir con los criterios de idoneidad
 - Evaluación de la Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo (FEVI).

- 5
 - Pruebas de embarazo para todas las mujeres en edad fértil. Se expondrán los métodos anticonceptivos apropiados y los posibles riesgos de exposición fetal a los sujetos durante la exploración. Métodos anticonceptivos dobles (uno de los cuales debe ser un método de barrera) para las mujeres en edad fértil (p. ej., anticonceptivos hormonales orales inyectables o implantables; dispositivo intrauterino; anticonceptivo de barrera con espermicida; o pareja vasectomizada) y se debe usar un solo método anticonceptivo para los varones (preservativo) desde el momento en que se firma el DCI, durante todo el estudio (incluidas las interrupciones de dosis) y durante 90 días después de la última dosis del Compuesto A. Esto se documentará en los documentos originales.
- 10
 - Las pruebas de laboratorio clínico deben finalizar en los 14 días anteriores a la primera dosis del Compuesto A.
 - Evaluaciones de eficacia/tumores
- 15
 - Los marcadores óseos (N-telopéptido y fosfatasa alcalina específica del hueso) se recogerán en la exploración (en los 14 días posteriores a la primera dosis)
 - Los marcadores neuroendocrinos y tumorales deben finalizar antes de la primera dosis del Compuesto A.
 - 20
 - CPM - PLProG y CgA
 - CNE - PLProG y CgA
 - CPNE - PSA, PLProG y CgA
 - 25
 - CHCN- Alfafetoproteína (AFP), PLProG y CgA
 - CMT - CEA, calcitonina, PLProG y CgA
 - Cáncer pancreático NE - PLProG, CgA y pancreastatina
 - 30
 - Otros CNE - PLProG y CgA
 - Otros marcadores tumorales según corresponda, es decir, CA125 para cáncer de ovario
- 35
 - Biopsia reciente de tumor
 - La recogida de tejido tumoral de archivo (FFIP) es obligatoria solo si no se realiza una biopsia reciente durante la selección
- 40
 - Únicamente para sujetos con CHC:
 - AFP
 - HBsAg, anti-HBs, anti-HBc y anti-VHC (solo exploración).
- 45
 - Medición de la carga vírica de la hepatitis B (ADN cuantitativo del VHB por PCR) si HBsAg, HBcAb total y/o HBcAb IgM son positivos.
- 50
 - Se requiere confirmación de la terapia antivírica con un agente antivírico apropiado para el VHB en sujetos con antígeno de superficie de hepatitis B positivo, HBcAb IgM y/o carga vírica - los agentes de primera línea apropiados incluyen entecavir, tenofovir y lamivudina (téngase en cuenta que la lamivudina tiene tasas de resistencia más altas).
- 55
 - Los sujetos con carga vírica de VHB positiva, HBcAb IgM y/o HBsAg deben derivarse a un hepatólogo si aún no están bajo el cuidado de un hepatólogo.

Las visitas y valoraciones se muestran en la Tabla 34. Los sujetos que completen 6 ciclos de tratamiento y continúen con el medicamento del estudio solo deben realizar visitas/evaluaciones clínicas el día 1 (\pm 3 días) de cada ciclo posterior (ciclos 6 y superiores), a menos que estén clínicamente indicadas visitas más frecuentes.

Todos los medicamentos y procedimientos concomitantes tomados o realizados a partir del momento en que el sujeto firma el DCI, a lo largo del estudio, y hasta 28 días después de la última dosis del Compuesto A, se registran en los documentos originales y en el CRDe.

Los acontecimientos adversos y los acontecimientos adversos graves (AAG) se registrarán desde el momento en que

un sujeto firma el DCI hasta 28 días después de la última dosis del Compuesto A.

Los sujetos que experimenten AA serán monitorizados con evaluaciones clínicas y pruebas de laboratorio relevantes, según lo determinado por el investigador. Se hace todo lo posible por documentar las fechas de resolución de los AA en curso. Los AA se registrarán en la página de AA del CRDe y en los documentos originales del sujeto. Siempre que sea posible, se deben obtener fotografías de erupciones cutáneas, que serán anónimas y se guardarán apropiadamente para su futura recuperación.

Se registra el peso del sujeto en el documento original y en el CRDe en las visitas enumeradas en la Tabla 34.

Las constantes vitales incluyen la temperatura corporal, la presión arterial, la frecuencia del pulso y la frecuencia respiratoria (solo para sujetos con tumores en el pulmón) y se registrarán durante el estudio en varios momentos para monitorizar la seguridad como se describe en la Tabla 34.

Las mediciones registradas se recopilarán en el documento original y en el CRDe.

La exploración física completa y el estado funcional del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este (EF ECOG; consulte el Apéndice D) se realizarán en las visitas enumeradas en la Tabla 34. Los resultados de ambos se registrarán en el documento original. Los resultados del EF ECOG también se recopilan en el CRDe.

Los hallazgos de la exploración física se clasifican como normales o anormales. Si es anormal, en los documentos originales se proporciona una descripción de la anomalía y la importancia clínica. Los cambios clínicamente significativos observados desde el inicio se registrarán en la sección de AA del CRDe.

Para sujetos con LNH, las mediciones de los ganglios linfáticos y la documentación de cualquier agrandamiento del bazo y/o del hígado, se registrarán en el documento original y en el CRDe.

Para sujetos con LNH, las evaluaciones de los síntomas B se realizarán en las visitas enumeradas en la Tabla 13 y los resultados se registrarán en los documentos originales y en el CRDe.

Los síntomas B son fiebre ($> 100,5^{\circ}\text{F}$ o 38°C) durante 2 o más semanas sin otra evidencia de infección, sudores nocturnos durante más de 1 mes sin evidencia de infección y pérdida de peso superior al 10 % en los 6 meses anteriores.

Se registrarán electrocardiogramas (ECG) convencionales de 12 derivaciones por triplicado en las visitas enumeradas en la Tabla 34. El ECG de 12 derivaciones debe realizarse antes de cualquier extracción de sangre si ambas están programadas para el mismo tiempo nominal. Los ECG de 12 derivaciones (12 derivaciones a un ritmo de informe de 25 mm/seg, la frecuencia ventricular, el intervalo PR, el complejo QRS, el intervalo QT y el intervalo QTcF), se realizarán después de que el sujeto haya permanecido en posición supina durante al menos 5 minutos.

Se realizarán ECG por triplicado (3 registros en intervalos de 2 ± 1 minuto) en:

- Exploración
- Ciclo 1

- Día 1: predosis (en los 30 minutos anteriores a la dosificación) y 2, 4, 8, 24 horas (± 10 minutos) posteriores a la dosis
- Días 8, 15 y 22: predosis (en los 30 minutos anteriores a la dosificación) y 4 horas (± 10 minutos) posteriores a la dosis

- Ciclos 2 y superiores

- Día 1: predosis (en los 30 minutos anteriores a la dosificación)

Se realizará un solo ECG en la visita de FdT.

Para los cronogramas posológicos alternativos, los ECG del Día 15 del Ciclo 1 se realizarán el último día de dosificación del Compuesto A en el Ciclo 1.

Los investigadores toman decisiones clínicas inmediatas en función de la interpretación de los resultados del ECG y proporcionan su evaluación global del ECG en el CRDe. Los cambios clínicamente significativos observados desde el inicio se registrarán en la sección de AA del CRDe.

Los resultados del ECG también se cargan en el laboratorio central de ECG para su análisis e interpretación definitivos.

En todos los sujetos, se realizará la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI), (ventriculografía nuclear [MUGA] o ecocardiograma [ECG]) durante la exploración. Las evaluaciones de seguimiento deben realizarse según esté clínicamente indicado. Las evaluaciones de seguimiento deben utilizar el mismo procedimiento que el utilizado en la evaluación de selección. Una reducción clínicamente significativa se define como una reducción absoluta de $\geq 20\%$ en la FEVI o como un descenso por debajo del 45 %.

Una mujer en edad fértil (MEF) se define como una mujer sexualmente madura que:

- No se ha sometido a histerectomía u ooforectomía bilateral, y
- No haber sido posmenopáusica naturalmente (la amenorrea después de la terapia contra el cáncer no descarta la posibilidad de tener hijos) durante al menos 24 meses consecutivos (p. ej., ha tenido menstruación en cualquier momento durante los 24 meses consecutivos anteriores).

El investigador clasificará a una mujer como una MEF de acuerdo con esta definición. No se requieren pruebas de embarazo para los sujetos que no son MEF, pero la justificación debe registrarse en el CRDe y en el documento original. Las pruebas de embarazo serán realizadas por el laboratorio local.

Para una MEF, las pruebas de embarazo se realizarán en las visitas enumeradas en la Tabla 34

- Se obtiene una prueba de embarazo en suero con una sensibilidad de al menos 25 mIU/ml en la exploración y una prueba de embarazo en suero u orina en las 72 horas previas al Día 1 del Ciclo 1 del tratamiento del estudio. El sujeto no puede recibir el Compuesto A hasta que el investigador haya verificado que las dos pruebas de detección de embarazo son negativas.
- Se debe realizar una prueba de embarazo en suero u orina (según el criterio del investigador y la sensibilidad mínima de la prueba [25 mIU/ml]) en las 72 horas anteriores al día 1 de cada
- ciclo y visita al final del tratamiento (FdT). El sujeto no puede recibir el Compuesto A hasta que el investigador haya verificado que la prueba de detección de embarazo es negativa.
- Una MEF o un sujeto masculino cuya pareja sea una MEF debe evitar actividades que puedan conducir a la concepción mientras recibe el Compuesto A y durante 90 días después de la última dosis del Compuesto A. La práctica de una verdadera abstinencia de la actividad sexual se controlará mensualmente y se documentará la fuente.

Los resultados de las pruebas de embarazo se registran en el documento original y en el CRDe.

Las siguientes evaluaciones de laboratorio se realizarán durante el estudio en los momentos descritos en la Tabla 34. Todas las muestras deben extraerse antes de la dosis, a menos que se especifique lo contrario. Las evaluaciones de laboratorio se registrarán en el documento original y en el CRDe, y son las siguientes:

- Hematología: hemograma completo (HC) incluyendo hemoglobina, hematocrito, recuento de GB con recuentos absolutos de parámetros de GB y recuento de plaquetas.
 - En el ciclo 1, día 1, se debe realizar el HC con recuentos absolutos y comparar los resultados con los criterios de entrada antes de la administración del fármaco
- Bioquímica del suero: albúmina, proteína total, bicarbonato o magnesio, fósforo, calcio, creatinina, urea/NUS, glucosa (en ayunas ≥ 6 h), potasio, sodio, cloruro, bilirrubina total (fraccionada si está fuera del intervalo normal), fosfatasa alcalina, AST o transaminasa glutámico oxalacética sérica (SGOT), ALT o transaminasa glutámico pirúvica sérica (SGPT), LDH y ácido úrico.
- Triglicéridos y colesterol en ayunas (≥ 6 horas).
- Bioquímica especial: amilasa, lipasa, subconjuntos de células T (CD4+ y CD8+), hormona estimulante de la tiroides (HET; si hay reflejo anormal a T4 libre).
- Coagulación: TP (o IIN) y TTPA
- Análisis de orina: tira reactiva
 - microscopía y relación albúmina-creatinina urinaria en caso de primera aparición de 2 o + proteínas o empeoramiento de la proteinuria.

- Determinación del aclaramiento de creatinina medido utilizando un marcador de filtración exógeno tal como iohexol, inulina, ^{51}Cr EDTA o ^{125}I iotalamato requerido en la exploración para cumplir con los criterios de inclusión si la creatinina sérica es $> 1,5 \times \text{LTLN}$ (consulte la sección 4.2).

- Los marcadores óseos (N-telopéptido y fosfatasa alcalina específica del hueso) se recogerán cada 3 ciclos y al FdT (a menos que se hayan realizado en los 28 días anteriores).

- Únicamente para sujetos con CHC:

- AFP (si está elevada al inicio)

- ADN del virus de la hepatitis B cuantitativo en sujetos con carga vírica de hepatitis B positiva al inicio del estudio y/o HBsAg positivo, HBcAb total y/o HBcAb IgM (los ciclos impares solo comienzan con el ciclo 3 o con mayor frecuencia a criterio del investigador) y al FdT.

- Solo para sujetos con CPNE:

- PSA

- Los marcadores neuroendocrinos y tumorales solo deben monitorizarse si están elevados al inicio del estudio, con excepción del PSA en CPNE.

- CPM - PLProG y CgA

- CNE - PLProG y CgA

- CPNE - PSA, PLProG y CgA

- CHCN- Alfafetoproteína, PLProG y CgA

- CMT - CEA, calcitonina, PLProG y CgA

- Cáncer Pancreático NE - PLProG, CgA y pancreastatina

- Otros CNE - PLProG y CgA

Se realiza una evaluación de FdT (véase la Tabla 34 para los procedimientos) para los sujetos que se retiran del tratamiento por cualquier motivo lo antes posible (≤ 28 días) una vez tomada la decisión de suspender el tratamiento de forma permanente.

Se realiza un seguimiento de todos los sujetos durante 28 días después de la última dosis del Compuesto A para informar sobre AA e información sobre la medicación concomitante. El contacto de seguimiento de seguridad de 28 días (± 3 días) puede ser por teléfono. Adicionalmente, se notificarán todos los AAG comunicados al investigador en cualquier momento posterior que se sospeche que estén relacionados con el Compuesto A.

Tras la visita de seguimiento de seguridad, todos los sujetos recibirán un seguimiento cada 3 meses posteriores (± 2 semanas) para el seguimiento de supervivencia durante hasta 2 años o hasta la muerte, pérdida de contacto durante el seguimiento o el final del ensayo, lo que se produzca primero. Las nuevas terapias para enfermedades deben recopilarse al mismo tiempo.

El seguimiento de supervivencia se puede realizar mediante la revisión de registros (incluyendo los registros públicos) y/o contacto telefónico con el sujeto, la familia o el médico tratante del sujeto.

Las evaluaciones del tumor se realizarán en la exploración e incluirán TC del tórax, abdomen y pelvis, y una exploración cerebral (TC o RMN) para sujetos con afectación cerebral conocida o con sospecha y todos los sujetos con CPNE. Después de la exploración, se realizarán evaluaciones radiológicas del tumor al final (Día 28 ± 7 días) de los Ciclos 2, 4 y 6, y después cada 3 ciclos a partir de entonces, usando las mismas modalidades de TC/RMN que se usan en la exploración. No es necesario obtener una exploración de FdT si la exploración anterior se realizó en el plazo de los 28 días.

- Además, para sujetos con LNH, se realizará una exploración con TEP con FDG o TEP con FDG/TC a menos que se sepa que los tumores no tienen avidéz por la FDG. Se obtendrá una exploración posterior para confirmar una RC.

- Para los sujetos con LNH con alteración conocida o sospechada de la médula ósea, se realizará una evaluación de la médula ósea con inmunofenotipado de flujo en el momento de la exploración y para confirmar una respuesta completa (RC).
- 5 • Para los sujetos con CMT, se realizará una gammagrafía ósea con isótopos de detección al inicio del estudio. Si esto sugiere metástasis óseas, se debe realizar una radiografía, TC o RM de la lesión ósea en BL y repetir la misma técnica en cada evaluación de eficacia programada.
- 10 • Para sujetos con CMT se debe realizar una resonancia magnética del hígado o, si no está disponible, una tomografía computarizada de triple fase con contraste mejorado. También se debe realizar una resonancia magnética o una tomografía computarizada del cuello. Estos deben realizarse al inicio del estudio y según lo estipulado anteriormente.
- 15 • Para los sujetos con CPNE, debe realizarse una gammagrafía ósea con radionúclido ^{99m}Tc-metilendifosfonato en el momento de la exploración y en todas las evaluaciones de eficacia posteriores.
- Para los sujetos con CHCN, debe realizarse una TC/RMN de triple fase con contraste del abdomen en el momento de la exploración y en todas las evaluaciones de eficacia posteriores.
- 20 Todos los sujetos que interrumpan el tratamiento por razones distintas a la progresión de la enfermedad, al inicio de una nueva terapia contra el cáncer o a la retirada del consentimiento de todo el estudio, tendrán un seguimiento de acuerdo con el calendario de evaluación del tumor especificado hasta la evolución y/o el inicio de nuevas terapias sistémicas contra el cáncer.
- 25 El investigador determinará la respuesta del tumor en cada evaluación posterior a la selección, basándose en los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) v 1.1 como se describe en el Apéndice B para tumores sólidos, los criterios de respuesta revisados para el linfoma maligno descritos en el Apéndice C para el LNH, PCWG3 2016 para CPNE (Apéndice J) y mRECIST para CHCN (Apéndice I).
- 30 Marcadores tumorales, es decir, PSA para CPNE y alfafetoproteína (AFP) para CHNE en la exploración, Día 1 de cada ciclo y FdT a menos que se documente previamente la evolución de la enfermedad.
- Los marcadores neuroendocrinos se realizarán en las visitas enumeradas en la Tabla 13 y los resultados se registrarán en los documentos originales y en el CRDe. Cualquier marcador neuroendocrino que se sepa que está elevado al inicio del estudio debe seguirse el día 1 de cada ciclo y al final de la terapia, a menos que se documente que el sujeto ha progresado previamente. Sin embargo, se debe seguir lo siguiente como mínimo:
- 35
- CPM - PLProG y CgA
 - CNE - PLProG y CgA
- 40
- CMT - CEA, calcitonina, PLProG y CgA
 - CPNE - PLProG y CgA,
 - Cáncer pancreático NE o de intestino delgado - PLProG, CgA y pancreastatina
- Las evaluaciones FC de la Parte A se describen a continuación. Las evaluaciones FC de la Parte B se proporcionarán después de que se recopilen suficientes datos de FC en la Parte A de este estudio.
- 45
- Para la evaluación FC del Compuesto A en plasma, se extraen muestras de sangre de todos los sujetos en los puntos temporales enumerados en la Tabla 35. El tiempo real de cada extracción de muestra se registrará en los documentos originales y en los cuadernos de recogida de datos en soporte electrónico (CRDe). Se puede realizar un análisis explorador de los metabolitos del Compuesto A en plasma utilizando las muestras de plasma recogidas para la evaluación FC.
- 50

Tabla 35. Calendario de toma de muestras farmacéuticas de sangre para la Parte A, Ciclo 1

Tiempo en horas relativo a la dosis del Compuesto A	Ventana de extracción	Día 1	Día 8	Día 15	Día 22
0 (antes de la dosis)	En los 30 minutos anteriores	X	X	X	X
1	± 5 minutos	X			X
2	± 10 minutos	X			X
4	± 10 minutos	X			X

(continuación)

Tiempo en horas relativo a la dosis del Compuesto A	Ventana de extracción	Día 1	Día 8	Día 15	Día 22
6	± 10 minutos	X			X
8	± 10 minutos	X			X
11	± 1 hora	X			X
24	± 1 hora	X			X
48	± 1 hora	X			X
72	± 2 horas	X			X
96	± 2 horas	X			X

El laboratorio promotor puede realizar análisis adicionales en las muestras FC para hacer un seguimiento de la seguridad del tratamiento del estudio o para comprender mejor la progresión de la enfermedad o la respuesta de la enfermedad al tratamiento del estudio.

Véanse en el Manual del Laboratorio y en el Apéndice G las instrucciones para la recogida, manipulación y procesamiento de las muestras.

Los programas para biomarcadores farmacodinámicos se proporcionan a continuación:

- Sangre entera para estudios de biomarcadores FD

- Ciclo 1 Día 1: predosis (≤ 3 horas)
- Ciclo 1 Día 3
- Ciclo 1 Día 5
- Ciclo 1 Día 8: predosis (≤ 3 horas)
- Ciclo 1 Día 24: predosis (≤ 3 horas)

- Suero para estudios de biomarcadores FD (solo sujetos con CNE y CPM)

- Ciclo 1 Día 1: predosis (≤ 3 horas)
- Ciclo 1 Día 3
- Ciclo 1 Día 8: predosis (≤ 3 horas)

- Tejido tumoral para estudios de biomarcadores FD

- Exploración: Día -28 a Día 1 (una vez cumplidos todos los criterios de inclusión y exclusión)
- Ciclo 1 Día 16 o 17 (+7 días)
- Opcional, en cualquier otro momento hasta la visita de FdT.

El laboratorio promotor puede realizar análisis adicionales en las muestras FD para hacer un seguimiento de la seguridad del tratamiento del estudio o para comprender mejor la evolución de la enfermedad o la respuesta de la enfermedad al tratamiento del estudio.

Las biopsias de tumores se recogerán siempre que sea seguro y factible en la Parte A. Las biopsias de tumores son obligatorias en la Parte B. La biopsia se recoge mediante biopsia quirúrgica (preferida) o aguja central (al menos 3 pases, si es posible) en la exploración y en el Ciclo 1 el Día 16 o 17 (+ 7 días). Si el tratamiento con el fármaco del estudio se interrumpe o reduce antes de este tiempo, la biopsia debe retrasarse hasta 1 a 2 días (+7 días) después de que el sujeto haya recibido dos dosis planificadas consecutivas del Compuesto A. Se debe proporcionar una muestra de archivo del tumor si no se recoge una biopsia nueva durante la exploración. La aspiración con aguja fina no es suficiente como fuente de material de biopsia tumoral. Las muestras deben procesarse como fijadas con formol e incluidas en parafina (FFIP). De manera óptima, las muestras de tejido tumoral (exploración y en tratamiento) se obtendrán del mismo sitio del tumor.

De manera adicional, se puede obtener una biopsia tumoral opcional tanto en la Parte A como en la Parte B, durante ciclos de tratamiento posteriores o después de la interrupción del tratamiento (en cualquier momento durante el período de seguimiento de 28 días), para dilucidar los efectos del tratamiento prolongado o los mecanismos de resistencia, respectivamente.

Descripción de los tratamientos del estudio

El compuesto A es una sal de besilato con un peso molecular de 609,65. Es un sólido de color blanco a amarillo pálido. El compuesto A se suministrará a la clínica en forma de cápsulas opacas de color naranja sueco que contienen únicamente el principio farmacéutico activo en dosis de 0,50 mg, 0,75 mg y 2,00 mg. Las cápsulas se suministrarán en frascos de HDPE con tapones a prueba de niños, etiquetados adecuadamente para su uso en investigación según la normativa de las autoridades sanitarias del país correspondiente.

El compuesto A se administrará una vez a la semana por la mañana en ayunas (es decir, ≥ 1 hora antes del desayuno) con al menos 240 ml de agua tras un ayuno nocturno de ≥ 6 horas tanto en la Parte A como en la B. Los sujetos deberán abstenerse de ingerir alimentos u otros medicamentos durante ≥ 1 hora después de cada dosis. Los sujetos se administrarán el Compuesto A por vía oral una vez a la semana en cada ciclo de 4 semanas (28 días). Se pueden implementar pautas posológicas alternativas en función de la revisión de la seguridad clínica y de los datos de laboratorio por parte del CRS. El compuesto A se administrará en la clínica después de completar las evaluaciones previas a la dosis. El tratamiento del estudio puede suspenderse si hay pruebas de evolución clínicamente significativas de la enfermedad, toxicidad inaceptable o decisión del médico/sujeto de abandonar el estudio.

A los efectos de las decisiones del aumento escalonado de la dosis, se inscribirán al menos 3 sujetos en cohortes sucesivas. La primera cohorte será tratada con la dosis inicial de 1,25 mg una vez a la semana. Los sujetos deben completar un mínimo de 1 ciclo de tratamiento con la evaluación mínima de seguridad y exposición al fármaco o haber tenido una TLD dentro del primer ciclo de tratamiento para ser considerado evaluable para decisiones de aumento de dosis. Las decisiones de aumento escalonado de la dosis se producirán cuando la cohorte de sujetos haya cumplido estos criterios. Las decisiones de aumento escalonado de la dosis serán tomadas por el CRS. Las decisiones se basarán en una síntesis de todos los datos relevantes disponibles de todos los niveles de dosis evaluados en el estudio en curso, incluyendo la información de seguridad, las TLD, todos los datos de toxicidad según los CTCAE de Grado ≥ 2 relacionados con el tratamiento durante el Ciclo 1 y los datos FC de sujetos evaluables. Los datos FC de los sujetos estarán disponibles de forma continua durante todo el estudio y la dosificación se adaptará consecuentemente. La dosis recomendada para la próxima cohorte de sujetos se guiará por el principio del MRLB con AECCS.

La metodología bayesiana adaptativa proporciona una estimación de los niveles de dosis del Compuesto A que no superan la DMT e incorpora toda la información de TLD a todos los niveles de dosis para esta estimación. En general, la siguiente dosis recomendada tendrá la mayor probabilidad de que la tasa de TLD se sitúe en el intervalo diana (la verdadera tasa de TLD se sitúa entre el 16 y el 33 %) y satisfará siempre el principio de AECCS. Según el AECCS, debería ser poco probable (<25 % de probabilidad posterior) que la tasa de TLD en la siguiente dosis supere el 0,33. En todos los casos, la dosis recomendada para la siguiente cohorte no superará un aumento del 100 % con respecto a la dosis anterior. El CRS puede recomendar aumentos más pequeños de la dosis tras considerar todos los datos clínicos disponibles.

El procedimiento para la inclusión de sujetos en cada cohorte de dosis y las disposiciones para las decisiones de aumento/disminución escalonado(a) de la dosis en el estudio es el siguiente:

1. Este estudio comenzará evaluando el Compuesto A en cohortes de al menos 3 sujetos evaluables en cada nivel de dosis. Inicialmente, los incrementos de dosificación entre cohortes serán del 100 %. Cuando un solo sujeto experimenta una TLD, o cuando 2 sujetos experimentan toxicidad relacionada con el tratamiento de grado ≥ 2 , el tamaño de la cohorte se puede aumentar a al menos 6 sujetos evaluables para las cohortes actuales y posteriores. El aumento en la dosis del Compuesto A será ≤ 50 % para cada cohorte de aumento escalonado de la dosis posterior. Una vez que 2 sujetos experimenten toxicidad relacionada con el tratamiento de grado ≥ 2 , la inscripción estará restringida a sujetos con CPM y otros CNE como CMT que secretan PLProG o, CgA o calcitonina (para sujetos con CMT) o pancreastatina (para CNE pancreático o de intestino delgado).

2. Tras completarse el Ciclo 1 para todos los sujetos evaluables en una cohorte, se utilizará el MRLB de dos parámetros con el principio del AECCS para hacer recomendaciones al CRS para el siguiente nivel de dosis con las siguientes excepciones:

- Si los 2 primeros sujetos de una cohorte experimentan TLD, no se incluirán sujetos adicionales en esa cohorte hasta que el modelo bayesiano se haya actualizado con esta nueva información. De mismo modo, el modelo se volverá a evaluar si 2 sujetos de una cohorte experimentan TLD antes de la inclusión de cualquier sujeto adicional.

3. Después de cada cohorte, el CRS se reunirá y revisará los datos de la evaluación del MRLB y la seguridad disponible (es decir, datos TLD y no TLD), FC, FD e información preliminar sobre eficacia. Las decisiones finales sobre el aumento escalonado de la dosis serán tomadas por el CRS.

Tras repetir las etapas anteriores, una dosis del Compuesto A puede determinarse como la DMT tras cumplir las siguientes condiciones:

- se han tratado al menos 6 sujetos evaluables con la dosis,

- la probabilidad posterior de que la tasa de TLD que se encuentra en el intervalo diana (16-33 %) a la dosis supere el 60 % o que se haya incluido en el estudio un número suficiente de sujetos para garantizar la precisión de la estimación de la DTM, a medida que la probabilidad posterior se acerca pero no supera el 60 %, y
- la dosis es la recomendada de acuerdo con el MRLB y está aprobada por el CRS.

El CRS puede suspender el aumento escalonado de la dosis en cualquier momento basándose en aspectos nuevos relacionados con la seguridad sin establecer la DTM. A criterio del CRS para comprender mejor la seguridad, tolerabilidad y FC del Compuesto A, se pueden incluir cohortes adicionales de sujetos a niveles de dosis anteriores o a niveles de dosis intermedios antes o mientras se procede con un aumento escalonado adicional de la dosis.

Sin embargo, las decisiones sobre las dosis durante el aumento escalonado no se limitan a estas dosis. Basándose en la recomendación del MRLB con respecto a la dosis más alta que no se puede superar en ningún punto de decisión durante el aumento escalonado y el aumento máximo de dosis permitido por el protocolo, se pueden administrar dosis intermedias a nuevas cohortes de sujetos posteriores.

La decisión de evaluar sujetos adicionales dentro de una cohorte de dosis, una cohorte de dosis más alta, cohortes de dosis intermedias, incrementos de dosis más pequeñas, pautas posológicas alternativas o declarar una DMT también será determinada por el CRS, basándose en su revisión de los datos de seguridad clínicos y de laboratorio.

Todos los sujetos que reciban al menos una dosis del Compuesto A serán evaluables en cuanto a la seguridad.

Después de administrar la primera dosis en cualquier cohorte durante el aumento escalonado de la dosis, se observan los sujetos de cada cohorte durante 28 días (Ciclo 1, intervalo de TLD) antes de que pueda comenzar la siguiente cohorte de dosis. No se incluirá más de un sujeto al día en una cohorte de aumento escalonado de la dosis determinada. Un sujeto evaluable para TLD se define como uno que:

- Ha recibido ≥ 75 % de la dosis total planificada del Compuesto A durante el Ciclo 1 sin experimentar una TLD, o
- ha experimentado una TLD tras recibir al menos una dosis del Compuesto A.

Se reemplazarán los sujetos no evaluables para TLD. Se pueden incluir sujetos adicionales dentro de cualquier cohorte de dosis a criterio del CRS. No se permitirá el aumento escalonado de la dosis intrasujeto durante el período de evaluación de la TLD.

La DTM es la dosis más alta a la que menos del 33 % de la población (no una muestra de la población) tratada con el Compuesto A sufre una TLD en el primer ciclo y al menos 6 sujetos evaluables han sido tratados con esta dosis.

Se puede evaluar una cohorte de dosis variable (p. ej., dosificación menos frecuente) para determinar con precisión la DMT a criterio del CRS.

Durante el aumento escalonado de la dosis, el período de evaluación de la TLD es el Ciclo 1 (28 días).

Los Criterios Terminológicos Comunes para Acontecimientos Adversos (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), versión 4.03, se utilizan como guía para clasificar la gravedad de los acontecimientos adversos. Una TLD se define como cualquiera de las siguientes toxicidades que se producen en la evaluación de la TLD a menos que se pueda determinar claramente que el acontecimiento no está relacionado con el Compuesto A. A continuación se describen las toxicidades limitantes de la dosis:

- Cualquier toxicidad no hematológica de grado 4 de cualquier duración
- Cualquier toxicidad no hematológica de Grado ≥ 3 A EXCEPCIÓN de:
 - Diarrea de Grado 3, náuseas o vómitos de ≤ 3 días de duración (con el tratamiento médico óptimo).
 - Erupción acneiforme de Grado 3, de tipo pustular o macropapular que se resuelve a Grado ≤ 2 en los 7 días posteriores a la interrupción del fármaco del estudio y no recurre al mismo nivel con la reanudación del fármaco del estudio a la misma dosis (con el tratamiento médico óptimo).
 - Cansancio de Grado 3 que se resuelve a Grado ≤ 2 en los 7 días posteriores a la interrupción del fármaco del estudio y no recurre al mismo nivel con la reanudación del fármaco del estudio a la misma dosis (con el tratamiento médico óptimo).
- Las siguientes toxicidades hematológicas:
 - neutropenia febril
 - neutropenia de Grado 4 que dure > 7 días
 - trombocitopenia de Grado 4 que dure > 7 días, trombocitopenia de Grado ≥ 3 con hemorragia clínicamente significativa

- Cualquier AA, a menos que se determine claramente que no está relacionado con el fármaco de estudio, que requiere una reducción del nivel de dosis durante el Ciclo 1.
- Cualquier otra toxicidad en cualquier momento durante el ensayo que el comité de seguridad considere limitante de la dosis.

5 Los cambios de laboratorio aislados sin signos o síntomas clínicos asociados (p. ej., hipomagnesemia, hipermagnesemia, hipoalbuminemia, hipofosfatemia, aumento o disminución del número de linfocitos) pueden no incluirse en esta definición. El CRS analizará y revisará estos hallazgos.

10 Se permiten reducciones de dosis en cualquier ciclo, incluyendo el Ciclo 1. Las reducciones de dosis que se produzcan en el Ciclo 1 durante el aumento escalonado de la dosis constituirán TLD, pero a los sujetos se les permitirá continuar con el Compuesto A a una dosis reducida.

15 Cuando se indique un ajuste de la dosis, se ajustará primero la frecuencia de la dosis. La omisión y reducción de la dosis se permiten previa consulta con el médico del estudio del laboratorio promotor. Una vez reducida la dosis, puede aumentarse escalonadamente cuando la toxicidad alcance el Grado ≤ 1 . Si la toxicidad reaparece con la dosis más alta, la dosis se reducirá por segunda vez, pero entonces no se permite un nuevo aumento escalonado. Si algún sujeto sigue experimentando una toxicidad inaceptable tras dos reducciones de la dosis (una por nivel de dosis), el compuesto A se suspenderá permanentemente.

20 No se permitirá el aumento escalonado de la dosis intrasujeto durante el período de evaluación de la TLD.

25 Cualquier AA que cumpla con la definición de TLD requerirá un ajuste de la frecuencia de la dosis y una posterior interrupción de la dosis si no se recupera. Las dosis deben retrasarse si cualquier toxicidad de Grado ≥ 2 relacionada con el tratamiento no se resuelve a Grado ≤ 1 en el momento de la siguiente dosis. Dichos casos deben comentarse con el médico del estudio del laboratorio promotor para determinar la duración óptima del retraso en la dosificación.

30 La toxicidad de Grado ≥ 3 o la toxicidad crónica de Grado 2 pueden justificar una reducción de la dosis del Compuesto A. Dichos casos deben comentarse con el médico del estudio del laboratorio promotor antes de realizarse cambios en la dosificación.

35 No se permitirá el aumento escalonado de la dosis intrasujeto durante el período de evaluación de la TLD, sin embargo, en los Ciclos ≥ 3 , los sujetos sin pruebas de evolución de la enfermedad que toleren la dosis asignada del Compuesto A pueden (a criterio del Investigador y en consulta y de acuerdo con el médico del estudio del laboratorio promotor) aumentar al nivel de dosis más alto que haya demostrado ser adecuadamente tolerado por al menos una cohorte de sujetos en este estudio (es decir, $\leq 33\%$ de los sujetos evaluables que hayan experimentado una TLD a ese nivel de dosis).

40 En la Parte B (fase de ampliación), no se permite el aumento escalonado de la dosis más allá de la DMT.

45 El tratamiento puede interrumpirse hasta las 4 semanas, hasta que la toxicidad (excluyendo la alopecia) alcance el Grado ≤ 1 o los niveles iniciales. El tratamiento puede reiniciarse con la misma dosis o con una dosis reducida, a criterio del Investigador. Cualquiera de dichas interrupciones del tratamiento debe comentarse con el médico del estudio del laboratorio promotor.

50 En el período de evaluación de TLD de la fase de aumento escalonado de dosis, una interrupción del tratamiento con >1 dosis olvidada del Compuesto A por razones distintas a la TLD hará que un sujeto no sea evaluable por TLD y requerirá la sustitución de ese sujeto en la cohorte de dosificación. Cualquiera de dichas interrupciones del tratamiento debe comentarse con el médico del estudio del laboratorio promotor.

55 Factores de crecimiento hematopoyético u otra ayuda hematológica, tal como la eritropoyetina, darbepoetina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (LCR GM) y transfusiones de GR o plaquetas, se permiten en el estudio con intención terapéutica. El uso terapéutico de G-CSF está permitido en cualquier momento para sujetos que experimenten neutropenia de Grado 3/4 o neutropenia febril de cualquier Grado. El uso profiláctico de factores de crecimiento de granulocitos (o granulocitos y macrófagos) no está permitido durante el Ciclo 1.

60 Los sujetos con neutropenia de Grado 3 o 4 y/o trombocitopenia de Grado 3 o 4 deben monitorizarse frecuentemente con pruebas de laboratorio hasta la resolución a Grado ≤ 1 . Debe considerarse la profilaxis antimicrobiana, antifúngica y antivírica, según proceda.

65 El dolor tumoral o el dolor inducido por el tratamiento se puede controlar con analgésicos opiáceos y relacionados con los opiáceos, tales como codeína, meperidina, propoxifeno o morfina, administrados a criterio del médico y según lo dictamine la necesidad médica. El riesgo de hemorragia, especialmente en el contexto de trombocitopenia, se debe considerar antes del uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y ácido acetilsalicílico (aspirina). Si es

posible, deben evitarse los AINE y el ácido acetilsalicílico (aspirina) y en su lugar se debe administrar paracetamol.

Se recomienda el uso de agentes de recubrimiento de la mucosa para la protección de la mucosa esofágica/gástrica a criterio del Investigador, así como la monitorización de los sujetos para detectar hemorragias GI. Sin embargo, los inhibidores de la bomba de protones pueden afectar a los marcadores neuroendocrinos en sujetos con CNE, por lo que se deben administrar preferentemente antagonistas del receptor de histamina (H2) si procede. Se alentará a los sujetos a que informen de los episodios de malestar o de dolor GI, pérdida de apetito, cambio en las heces o sangre en las heces.

Se recomienda que los sujetos con diarrea sean tratados de acuerdo con las pautas proporcionadas en el Apéndice F. La medicación con antidiarreicos, tal como loperamida, debe iniciarse tan pronto como aparezca la diarrea de Grado 1-2. Se pueden administrar medicamentos antidiarreicos como profilaxis y para el tratamiento de la diarrea. La deshidratación y los trastornos electrolíticos deben corregirse rápidamente. Deben considerarse medidas generales para mejorar la diarrea, tales como una dieta baja en fibra y un mayor consumo de líquidos, y debe vigilarse de cerca el peso.

La sobredosis, como se define para este protocolo, se refiere únicamente a la dosificación del Compuesto A. Según la dosis, una sobredosis se define como la siguiente cantidad sobre la dosis especificada en el protocolo del Compuesto A asignada a un sujeto determinado, independientemente de cualquier acontecimiento adverso o secuela asociada:

- PO cualquier cantidad por encima de la dosis especificada en el protocolo

Según el cronograma o la frecuencia, una sobredosis se define como algo más frecuente que el cronograma o la frecuencia requeridos por el protocolo.

Los datos completos sobre la administración de fármacos, incluyendo cualquier sobredosis, independientemente de si la sobredosis fue accidental o intencionada, deben anotarse en el cuaderno de recogida de datos.

Los sujetos elegibles se incluirán secuencialmente en la Parte A (aumento escalonado de la dosis). La inclusión en la Parte B (ampliación de dosis) se estratificará por cohorte de enfermedad y pauta posológica, según sea aplicable.

Se utilizará un sistema de tecnología de respuesta interactiva (TRI) para rastrear las asignaciones de los sujetos a los niveles de dosis en la Parte A y a las cohortes tumorales en la Parte B.

La(s) etiqueta(s) del Compuesto A incluirá(n), pero sin limitación, nombre del laboratorio promotor, la dirección y el número de teléfono, el número de protocolo, El Compuesto A, la forma de dosificación y la concentración (cuando corresponda), la cantidad de Compuesto A por recipiente, el número de lote, la fecha de caducidad (cuando corresponda), la identificación del medicamento/el número de kit, las instrucciones de dosificación, las condiciones de conservación y las declaraciones de precaución necesarias y/o las declaraciones reglamentarias, según corresponda. Se puede incluir información adicional en la etiqueta según corresponda conforme a las regulaciones locales.

Celgene (persona designada) revisará con el Investigador y el personal pertinente del centro, los procedimientos para documentar la recepción del Compuesto A, así como los procedimientos de recuento, aceptación del Compuesto A y documentar este proceso. Celgene (o la persona designada) también revisará con el Investigador y el personal pertinente del centro, el proceso de devolución, eliminación y/o destrucción del Compuesto A, incluidas las responsabilidades del centro frente a Celgene (o la persona designada).

Únicamente el farmacéutico o la persona designada por el investigador dispensará el Compuesto A. Se debe mantener un registro del número de cápsulas del Compuesto A dispensadas y tomadas por cada sujeto. El farmacéutico o la persona designada por el Investigador documentará las dosis dispensadas/administradas en los registros del estudio apropiados.

Medicamentos y procedimientos concomitantes

Todos los medicamentos (excluyendo la terapia oncológica previa para el tumor en evaluación) tomados a partir del momento en que el sujeto firma el DCI y todos los tratamientos concomitantes durante el estudio hasta 28 días después de la suspensión del tratamiento, junto con la dosis, la frecuencia de la dosis y los motivos de uso de la terapia, se documentarán en los documentos originales y en el CRDe de la medicación concomitante.

Toda quimioterapia previa (biológica, inmunológica o radioterapia) y cirugía contra el cáncer antes de la administración del fármaco del estudio, se registrará en la sección correspondiente del CRDe.

El investigador indicará a los sujetos que notifiquen al personal del estudio sobre cualquier medicamento nuevo que tomen después de firmar el DCI. Todos los medicamentos y terapias no farmacológicas significativos (medicamentos a base de hierbas, terapia física, etc.) y cualquier cambio en la dosificación con medicamentos existentes se

documentará en los CRDe.

Se debe utilizar cualquier medicación/terapia concomitante que se considere necesaria para el cuidado del sujeto. Pueden realizarse evaluaciones FC repetidas si se realizan cambios en los medicamentos concomitantes que se sospecha que afectan a la absorción o al metabolismo del fármaco. Se permiten los siguientes medicamentos y procedimientos concomitantes:

- Los sujetos con diarrea de Grado ≥ 1 deben iniciar de inmediato el tratamiento con difenoxilato/atropina (Lomotil) o loperamida (Imodium), o un remedio alternativo de venta sin receta para la diarrea. La medicación previa con medicación antidiarreica para dosis posteriores del Compuesto A puede ser apropiada y debe comentarse con el médico del estudio del laboratorio promotor.
- Los antieméticos se suspenderán hasta que los sujetos hayan experimentado náuseas o vómitos CTCAE \geq Grado 1. Después, los sujetos pueden recibir antieméticos profilácticos a criterio del Investigador, incluida la dexametasona.
- Los agentes profilácticos, protectores de la mucosa, pueden ser apropiados a criterio del Investigador. Sin embargo, los inhibidores de la bomba de protones pueden afectar a los marcadores neuroendocrinos en sujetos con CNE, por lo que se deben administrar preferentemente antagonistas del receptor de histamina (H2) si procede.
- Se requiere terapia antivírica con un agente antivírico apropiado para el VHB en sujetos con CHC con antígeno de superficie de hepatitis B positivo, HBcAb IgM y/o carga vírica - los agentes de primera línea apropiados incluyen entecavir, tenofovir y lamivudina (téngase en cuenta que la lamivudina tiene tasas de resistencia más altas). Los regímenes apropiados para el tratamiento del VHC no deben interrumpirse al administrar el Compuesto A.
- El uso terapéutico de factores de crecimiento de granulocitos está permitido en cualquier momento para los sujetos que experimenten neutropenia febril o neutropenia de Grado 3/4. Profilaxis habitual con factor estimulante de colonias de granulocitos o estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- Los sujetos que reciben dosis estables de eritropoyetina recombinante o darbepoetina alfa durante al menos 4 semanas antes de comenzar con el Compuesto A, pueden continuar con sus dosis previas al tratamiento durante todo el estudio. Los sujetos pueden iniciar un tratamiento *de novo* con agentes estimulantes de eritropoyetina (AEE) a partir del Ciclo 2 para las anemias hipoproliferativas secundarias a una exposición previa a la quimioterapia, siempre que no haya sospecha clínica de una causa concurrente de la anemia (p. ej., inducida por el Compuesto A).
- Se permite la vacunación parenteral contra la gripe.
- No es necesaria la profilaxis sistemática de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, a criterio del Investigador, durante el estudio podrá aplicarse profilaxis antibiótica, antivírica, antineumocística, antifúngica o de otro tipo.
- Se permite el tratamiento con bifosfonatos (p. ej., pamidronato, zolendronato) u otros agentes (p. ej., denosumab) para prevenir o retrasar la evolución de las metástasis óseas. Se recomienda mantener una pauta posológica estable durante todo el estudio.
- La radioterapia paliativa focal para el tratamiento de síntomas relacionados con el cáncer (p. ej., dolor óseo localizado) está permitida durante el tratamiento del estudio a criterio del investigador, siempre que no sea indicativa de evolución de la enfermedad, en cuyo caso deberá interrumpirse la participación del sujeto.
- Los sujetos pueden recibir dosis fisiológicas sustitutivas de glucocorticoides (hasta el equivalente a 10 mg diarios de prednisona) como tratamiento de mantenimiento.
- Se permiten terapias hormonales de mantenimiento en sujetos con antecedentes de cáncer de mama o próstata.
- Se pueden utilizar análogos de somatostatina (ASS) para el control de los síntomas, según corresponda.

No se deben utilizar otras terapias en investigación mientras el sujeto esté en el estudio.

- Mientras el sujeto participe en el estudio, no se le administrará terapia contra el cáncer (quimioterapia, terapia biológica o de investigación y cirugía) distinta de los tratamientos del estudio. Si se requiere dicho tratamiento, el sujeto debe suspender el estudio. No se permite el tratamiento con agentes inmunosupresores mientras el sujeto participe en el estudio. Si se requiere dicho tratamiento, el sujeto debe suspender el estudio.

No se permite el tratamiento con dosis terapéuticas crónicas de anticoagulantes (p. ej., warfarina, heparina de bajo

peso molecular, inhibidores del Factor Xa, antagonistas de trombina). La administración profiláctica a corto plazo de anticoagulantes debe considerarse en sujetos si está médicamente indicada (p. ej., sujetos hospitalizados, postoperatorios) bajo la cuidadosa consideración del Investigador.

- 5 El compuesto A puede ser un sustrato de CYP3A4. Deben evitarse los fármacos que sean inductores o inhibidores fuertes conocidos de estas enzimas CYP. Si es necesario el uso de uno de estos fármacos, los riesgos y beneficios deben ser comentados con el médico del estudio del laboratorio promotor antes de su uso concomitante con el Compuesto A.

- 10 Son ejemplos de estos medicamentos (no incluidos):

- Inhibidores de CYP3A4/5: atazanavir, claritromicina, indinavir, itraconazol, ketoconazol, nefazodona, nelfinavir, ritonavir, saquinavir y telitromicina
- Inductores CYP3A4/5: rifampicina y carbamazepina

- 15 Los inhibidores de la bomba de protones deben evitarse, si es posible, en los sujetos con CNE debido a un posible efecto sobre los biomarcadores. Si es clínicamente apropiado, los sujetos deben cambiar a un antagonista H2 al menos 7 días antes de la primera dosis.

- 20 En vista del potencial de trombocitopenia, si es posible, deben evitarse los AINE y el ácido acetilsalicílico (aspirina) y en su lugar se debe administrar paracetamol.

Aspectos estadístico-locales

- 25 Los objetivos principales de este estudio son determinar la seguridad, tolerabilidad y DTM del Compuesto A cuando se administra por vía oral una vez a la semana durante 4 semanas (Ciclo de 28 días) a sujetos con tumores sólidos recidivantes y/o resistentes (incluido CNE) y LNH. Los objetivos secundarios son realizar una evaluación preliminar de la actividad antitumoral del Compuesto A y determinar sus características FC.

- 30 Los resúmenes de datos/análisis estadísticos se realizarán por parte del estudio (Parte A o B), calendario de dosificación, nivel de dosis (Parte A) y cohorte tumoral (Parte B), según corresponda.

Las definiciones de la población de estudio son las siguientes:

- 35
- Población inscrita - Todos los sujetos que cumplen con los criterios de inclusión/exclusión.
 - Población tratada - Todos los sujetos que participan y que reciben al menos una dosis del

Compuesto A.

- 40
- Población Evaluable en cuanto a la Eficacia (EE) - Todos los sujetos que participan en el estudio, cumplen los criterios de idoneidad, completan al menos un ciclo del Compuesto A (tomando al menos el 75 % de las dosis asignadas) y son objeto de una evaluación tumoral inicial y de al menos una evaluación posterior a la inicial válida.
 - Población Evaluable en cuanto a la Farmacocinética (FC) - todos los sujetos que participan y que reciben al menos una dosis del Compuesto A, y que tienen al menos una concentración medible del Compuesto A
- 45
- Población Evaluable en cuanto a los Biomarcadores (EB) - todos los sujetos que participan, que reciben al menos una dosis del fármaco del estudio y que son objeto de al menos una evaluación de biomarcadores, excluyendo las evaluaciones descalificadas.

- 50 Durante la Parte A del estudio, se utilizará un modelo de regresión logística bayesiana (RLB) adaptativa (con 2 parámetros) guiado por el principio de aumento escalonado con control de la sobredosis (AECCS). En este estudio no se realizaron cálculos estadísticos formales para determinar el tamaño de la muestra. El número real de sujetos dependerá del número de niveles de dosis/cohortes que se prueben. Sin embargo, el número previsto de sujetos será de aproximadamente 50.

- 55 Una vez determinada la DMT de la Parte A, en la Parte B inscribirán aproximadamente 20 sujetos adicionales por tipos de tumores preespecificados.

- 60 Para la Parte B, el tamaño de las muestras no se determina basándose en el cálculo de la potencia sino más bien en cuestiones clínicas, empíricas y prácticas utilizadas tradicionalmente para estudios exploradores de este tipo. Durante la ampliación de la dosis de la Parte B, inicialmente se incluirán al menos 14 sujetos evaluables en cuanto a la eficacia en cada cohorte tumoral. La cohorte tumoral se ampliará a aproximadamente 20 sujetos si se observa una respuesta o una DE de 4 meses o mayor.

- 65 En la Parte A, las características iniciales de los sujetos se resumirán por cohorte de dosis para la población incluida. En la Parte B, las características iniciales de los sujetos se resumen por tipo de tumor. La edad, el peso, la altura, y

otras variables iniciales y demográficas continuas se resumirán utilizando estadísticas descriptivas. El estado funcional, sexo, raza y otras variables categóricas, se resumirán con tabulaciones de frecuencia. Los datos de los antecedentes médicos se resumirán usando tabulaciones de frecuencia por categoría de órgano, aparato o sistema y término preferente.

La disposición de los sujetos (asignación de la población de análisis, en curso, interrumpida, junto con la razón principal) del tratamiento y del estudio se resumirá utilizando la frecuencia y el porcentaje. Se facilitará un resumen de los sujetos inscritos por centro. Las infracciones del protocolo se resumirán mediante tabulaciones de frecuencia. También se facilitarán los correspondientes listados de materias de apoyo.

Los análisis de eficacia se basarán en la población tratada e incluirán resúmenes de la tasa de beneficio clínico (TBC), de la tasa de respuesta objetiva (TRO), de la duración de la respuesta o de la enfermedad estable, de la supervivencia sin progresión (SSP), del tiempo hasta la progresión (THP) y de la SG por cohorte de dosis y pauta posológica (Parte A) o del tipo de tumor y pauta posológica (Parte B). La respuesta tumoral (RC, RP, DE, EP o no evaluable) la evaluará los investigadores de acuerdo con los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST), versión 1.1, mRECIST para CHNE, PCWG23 para los criterios del CPNE y GIT. La TBC se define como las respuestas tumorales (según la evaluación de los investigadores) de RC, RP y SD duradera (SD de ≥ 4 meses de duración). La TRO se define como el porcentaje de sujetos cuya mejor respuesta es la RC o RP. Cuando la EE es la mejor respuesta, debe documentarse radiográficamente al menos una vez después de la entrada en el estudio tras un intervalo mínimo de 8 semanas (es decir, coincidiendo con el primer punto de tiempo de evaluación de la respuesta posterior al momento inicial menos el intervalo de evaluación). Si no se cumple el tiempo mínimo para una mejor respuesta de EE, la mejor respuesta del sujeto dependerá del resultado de las evaluaciones posteriores. Por ejemplo, un sujeto que presente EE en la primera evaluación (donde la primera evaluación no cumple con los criterios de duración mínima para la EE) y EP en la segunda evaluación, se clasificaría como aquel que tiene como mejor respuesta de EP. Un sujeto con el que se pierde el contacto durante el seguimiento tras la primera evaluación de EE se consideraría no evaluable, si no se cumplen los criterios de duración mínima de la EE.

Se proporcionan intervalos de confianza exactos de Clopper-Pearson del 95 % bilaterales para las estimaciones de la TRO y la TBC. Se realizarán análisis similares para incluir a los sujetos con respuestas confirmadas, así como para la población evaluable en cuanto a la eficacia.

Para los sujetos con mejor respuesta de RC o RP, la duración de la respuesta se mide desde el momento en que se cumplen por primera vez los criterios para la RC/RP (lo que se registre primero) hasta la primera fecha en la que se documenta objetivamente la progresión de la enfermedad. Para los sujetos con mejor respuesta de EE, la duración de la EE se mide desde la fecha de la primera dosis hasta que se cumplen los criterios de progresión. Si la progresión no se documenta antes de la suspensión del Compuesto A, la duración de la respuesta global y la duración de la EE serán objeto de censura estadística en la fecha de la última evaluación adecuada del tumor.

La duración de la respuesta/EE basada en las evaluaciones de los investigadores se resumirá mediante estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, mediana, mínima y máxima) para la población tratada. A excepción de las medianas, que se calcularán basándose en los valores observados y que han sido objeto de censura estadística utilizando el método de Kaplan-Meier, los restantes datos estadísticos (media, desviación estándar, mínima y máxima) se calcularán basándose únicamente en los valores observados. El THP se define como el tiempo desde la primera dosis hasta la progresión del tumor.

La supervivencia sin progresión (SSP) se define como el tiempo desde la primera dosis del Compuesto A hasta la primera aparición de progresión de la enfermedad o muerte por cualquier causa. Los sujetos que no progresen ni fallezcan en una fecha de límite de datos serán objeto de censura estadística en la fecha de su última evaluación tumoral adecuada. La SSP se resumirá utilizando estadística descriptiva (media, desviación estándar, mediana, mínima y máxima) para la población tratada. A excepción de la mediana, que se calculará basándose en los valores observados y que han sido objeto de censura estadística utilizando el método de Kaplan-Meier, los restantes datos estadísticos (media, desviación estándar, mínima y máxima) se calcularán basándose únicamente en los valores observados.

La Supervivencia Global (SG) se mide como el tiempo desde la primera dosis del Compuesto A hasta la muerte por cualquier causa, y se analizará de manera similar a la descrita para la SSP.

Se resumirán las evaluaciones de los marcadores neuroendocrinos séricos a lo largo del tiempo en sujetos neuroendocrinos.

Los acontecimientos adversos, incluidos los acontecimientos adversos que se presentan con el tratamiento (AAT), las evaluaciones de laboratorio, las constantes vitales, los resultados de ECG, el estado funcional del ECOG, la evaluación de FEVI, las exploraciones físicas, las constantes vitales, la exposición al tratamiento del estudio, la evaluación de los medicamentos concomitantes y las pruebas de embarazo para mujeres en edad fértil, se resumirán para la población tratada (por cohorte de dosis en la Parte A y tipo de tumor en la Parte B).

- Los acontecimientos adversos observados se clasificarán utilizando el Diccionario Médico para actividades de Registro Farmacéutico (MedDRA, *Medical Dictionary for Regulatory Activities*), Versión 18.1 o superior, categoría de órgano, aparato o sistema (SOC, *System Organ Class*) y Término Preferente (TP). En el análisis por sujeto, un sujeto que tiene el mismo AA más de una vez se contará solo una vez. Todos los acontecimientos adversos también se resumirán por SOC, TP y grado CTCAE del NCI (Versión 4.0 o superior). Los acontecimientos adversos que conducen a la suspensión del tratamiento del estudio, los clasificados como de Grado 3 o 4, los AA relacionados con el fármaco del estudio y los AAG (incluyendo las muertes) se tabularán por separado. Se facilitarán listados por sujeto de todos los AA, AAT, AAG (incluyendo las muertes) y su atribución.
- 10 Los resultados del laboratorio clínico se resumirán de forma descriptiva por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B) y visita, lo que también incluirá una visualización de los cambios con respecto al momento inicial. Las tablas de cambio que demuestran los cambios (bajo/normal/alto) desde el valor inicial hasta el peor valor de laboratorio posterior al valor inicial, se mostrarán en tabulaciones cruzadas por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B). También se presentarán tablas de cambio similares que demuestren el cambio de los grados de CTCAE del NCI desde el valor inicial hasta el peor grado de gravedad posterior al valor inicial durante el periodo de tratamiento por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B) para los analitos aplicables. Se facilitará listados de los datos de laboratorio clínico anormales según los grados de gravedad del NCI CTCAE (si corresponde), los indicadores anormales (bajos o altos) y la importancia clínica de estos últimos.
- 15
- 20 Se proporcionarán representaciones gráficas (p. ej., diagramas de "espagueti" o diagramas de caja) para los principales analitos de laboratorio.
- Las estadísticas descriptivas de las constantes vitales, tanto los valores observados como los cambios con respecto al momento inicial, se resumirán por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B) y visita. Las tablas de cambios que demuestran los cambios desde el momento inicial hasta el peor valor posterior al valor basal se mostrarán en tabulaciones cruzadas por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B). Las mediciones de las constantes vitales se enumerarán por sujeto y visita.
- 25
- 30 Los parámetros del ECG y los cambios con respecto al momento inicial se resumen por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B) y visita utilizando estadísticas descriptivas. Los valores de QTc anormales posteriores al momento inicial (tanto QTcF como QTcB) se resumen utilizando tabulaciones de frecuencia para las 5 categorías siguientes:
- QTc > 450 ms
 - QTc > 480 ms
 - QTc > 500 ms
 - aumento de QTc con respecto al momento inicial > 30 ms
 - aumento de QTc con respecto al momento inicial > 60 ms
- 35
- 40 El cambio desde la evaluación inicial a la peor evaluación cualitativa posterior a la inicial de la anormalidad (es decir, 'Normal', 'Anormal, no clínicamente significativo' y 'Anormal, clínicamente significativo' o 'Normal' y 'Anormal') se mostrará en tabulaciones cruzadas por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B). Se proporcionará un listado de parámetros de ECG por sujeto, por visita.
- 45 No está previsto ningún análisis intermedio formal. Los datos se revisarán de forma continua.
- Se utilizará un MRLB adaptativa guiado por el aumento escalonado con el principio del AECCS para hacer recomendaciones de dosis y estimar la DMT durante la fase de aumento escalonado del estudio (para más detalles, véase el Apéndice E).
- 50 La relación de la TLD en la parte del estudio de aumento escalonado, se describirá mediante el siguiente modelo de regresión logística bayesiana:

$$\log\left(\frac{p_j}{1-p_j}\right) = \log \alpha + \beta \cdot \log\left(\frac{d_j}{d^*}\right), \alpha > 0, \beta > 0$$

- 55 donde p_j son tasas de TLD en dosis, d_j son niveles de dosis, d^* =dosis de referencia de 30 mg, α es la probabilidad de TLD a d^* .
- 60 A partir de las estimaciones previas (medianas) de los datos preclínicos y de los intervalos de confianza amplios para las probabilidades de una TDL en cada dosis, se obtiene una previa normal bivalente imprecisa para los parámetros del modelo ($\log(\alpha), \log(\beta)$). Se supone que la DMT anterior es de 30 mg basándose en datos preclínicos. Se supone que la probabilidad de TLD para la primera dosis es baja. Los parámetros de las distribuciones previas de los parámetros del modelo se seleccionan basándose en el método para construir una distribución previa débilmente

informativa como se describe en Neuenschwander et al. (2015), y se proporcionan en la Tabla 36.

Tabla 36. Parámetros previos para la distribución normal bivalente de los parámetros del modelo

Parámetros	Medias	Desviación estándar	Correlación
$\log(\alpha), \log(\beta)$	$(-0,693, 0,205)$	$(2, 0,75)$	0

5 Los niveles de dosis provisionales son: 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 22,5 mg, 30 mg y 37,5 mg. Sin embargo, es posible que los niveles de dosis reales seleccionados para el ensayo difieran de los niveles de dosis provisionales, en función de la información de seguridad que vaya surgiendo.

10 Después de cada cohorte de sujetos, se obtienen las distribuciones posteriores para las probabilidades de una tasa de TLD a diferentes niveles de dosis. Los resultados de este análisis se resumen en cuanto a las probabilidades estimadas que tendrá la verdadera tasa de TLD a cada nivel de dosis de estar en cada uno de los siguientes intervalos:

- [0, 0,16) infradosificación
- [0,16, 0,33) toxicidad diana
- 15 • [0,33, 1.00] toxicidad excesiva

20 Siguiendo el principio de aumento escalonado con AECCS, después de cada cohorte de sujetos, la dosis recomendada es la que tiene la mayor probabilidad posterior de que la tasa de TLD se encuentre en el intervalo diana [16 %, 33 %) entre las dosis que cumplen el AECCS, es decir, es poco probable (< 25 % de probabilidad posterior) que la tasa de TLD a la dosis se encuentre en el intervalo de toxicidad excesiva.

25 Cabe señalar que la dosis que aumenta al máximo la probabilidad posterior de toxicidad específica es la mejor estimación de la DMT, pero puede no ser una dosis admisible según el criterio de sobredosis si la cantidad de datos es insuficiente. Si se utiliza información previa vaga para las probabilidades de TLD, en las primeras etapas del estudio, este procedimiento de aumento escalonado reflejará una estrategia conservadora.

30 La dosis recomendada por modelo de regresión logística bayesiana adaptativa puede considerarse una guía e información que debe integrarse con una evaluación clínica de los perfiles de toxicidad observados en el momento del análisis para determinar el siguiente nivel de dosis que se debe investigar.

Los parámetros FC plasmáticos, tales como el ABC, la $C_{m\acute{a}x}$, el $T_{m\acute{a}x}$, la $t_{1/2}$, el CL/F y la Vz/F del Compuesto A, se calcularán mediante el método de análisis no compartimental a partir de los perfiles de concentración en plasma con respecto al tiempo del Compuesto A. Se pueden calcular otros parámetros FC según corresponda.

35 Se proporcionarán estadísticas resumidas que incluyan el número de sujetos (N), la media, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (CV%), la media geométrica, el CV% geométrico, la mediana, el mínimo y el máximo para la concentración del Compuesto A por punto temporal nominal, día de estudio y cohorte de dosis. Las representaciones de las concentraciones plasmáticas medias e individuales se presentarán en escalas tanto originales como semilogarítmicas. También se proporcionarán estadísticas resumidas para los parámetros FC del Compuesto A por día de estudio y cohorte de dosis, y se presentarán en forma de tabla.

45 Se puede realizar un análisis FC poblacional para el Compuesto A para explorar la variabilidad inter-individual de la exposición del fármaco en plasma y los factores contribuyentes (covariables). Se explorará la relación entre la dosis del Compuesto A, las exposiciones plasmáticas y los criterios de valoración clínicos seleccionados (por ejemplo, medidas de toxicidad, eficacia y/o biomarcadores). El modelo FC poblacional, junto con el conocimiento sobre la respuesta a la exposición, se puede utilizar para ayudar a identificar el régimen de dosificación para los estudios de la Parte B o de la Fase 2.

50 Se proporcionarán datos estadísticos descriptivos (N, media, DE, mediana, min y máx) de los valores iniciales, valores posteriores a los iniciales y cambios desde el momento inicial o cambio porcentual desde el momento inicial de los biomarcadores, incluidos los marcadores neuroendocrinos, por cohorte de dosis (Parte A) o tipo de tumor (Parte B) y visita.

55 Se representarán los resultados de los biomarcadores de los sujetos a lo largo del tiempo. La comparación de los niveles de biomarcadores antes y durante el tratamiento se realizará mediante la prueba del orden con signo de Wilcoxon. Si se pueden obtener resultados suficientes y válidos de los ensayos de biomarcadores, se examina la relación entre los cambios porcentuales en los niveles de biomarcadores y los criterios de valoración clínicos, incluyendo la TRO y la TBC. El modelo FC poblacional, junto con el conocimiento sobre la respuesta a la exposición, se puede utilizar para ayudar en la identificación del régimen de dosificación para los estudios de la Parte B o la Fase 2.

60

Acontecimientos adversos

Un AA es un suceso médico nocivo, involuntario o adverso que puede aparecer o empeorar en un sujeto durante el curso de un estudio. Puede ser una nueva enfermedad intercurrente, una enfermedad concomitante que empeore, una lesión o cualquier deterioro concomitante de la salud del sujeto, incluyendo los valores de análisis de laboratorio, independientemente de la etiología. Cualquier empeoramiento (es decir, cualquier cambio adverso clínicamente significativo en la frecuencia o intensidad de un estado preexistente) debe considerarse un AA. Un diagnóstico o síndrome debe registrarse en la página de AA del CRD en lugar de los signos o síntomas individuales del diagnóstico o síndrome.

El abuso, la interrupción, la sensibilidad o la toxicidad de un producto en investigación debe informarse como un AA. La sobredosis, accidental o intencionada, ya esté asociada o no con un AA debe informarse en el CRD de sobredosis. Cualquier secuela de una sobredosis accidental o intencionada de un producto en investigación debe informarse como AA en el CRD AA. Si la secuela de una sobredosis es un AAG, se debe informar la secuela en un formulario de informe de AAG y en el CRD AA. La sobredosis que produzca el AAG debe identificarse como la causa del acontecimiento en el formulario de informe de AAG y en el CRD, pero no debe informarse como un AAG en sí mismo.

En caso de sobredosis, el sujeto debe ser controlado según corresponda y debe recibir medidas de apoyo según sea necesario. No existe un antídoto específico conocido para la sobredosis del compuesto A. El tratamiento real dependería de la gravedad de la situación clínica y del criterio y la experiencia del médico tratante.

Todos los sujetos serán controlados en cuanto a los AA durante el estudio. Las evaluaciones pueden incluir el seguimiento de cualquiera o todos los parámetros siguientes: síntomas clínicos del sujeto, hallazgos de laboratorio, patológicos, radiológicos o quirúrgicos, hallazgos de la exploración física o hallazgos de otras pruebas y/o procedimientos.

El investigador registrará todos los AA desde el momento en que el sujeto firma el consentimiento informado hasta 28 después de la última dosis del compuesto A, así como aquellos AAG comunicados al investigador en cualquier momento posterior, que se sospeche están relacionados con el compuesto A. Los AA y los AAG se registrarán en la página de AA del CRD y en los documentos fuente del sujeto. Todos los AAG se deben informar al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene en el plazo de las 24 horas posteriores al conocimiento por parte del investigador, por fax u otro método apropiado, utilizando el formulario de informe de AAG o un formulario equivalente aprobado.

Un investigador cualificado evaluará todos los acontecimientos adversos en cuanto a:

Gravedad

Un AAG es cualquier AA que ocurre a cualquier dosis que:

- Produce la muerte;
- Es potencialmente mortal (es decir, en la opinión del investigador, el sujeto está en riesgo inmediato de morir por el AA);
- Requiere la hospitalización del paciente o la prolongación de la hospitalización existente (la hospitalización se define como una admisión como paciente hospitalizado, independientemente de la duración de la estancia);
- Produce una discapacidad/incapacidad persistente o significativa (una interrupción sustancial de la capacidad del sujeto para llevar a cabo las funciones normales de la vida);
- Es una anomalía congénita/defecto de nacimiento;
- Constituye un acontecimiento médico importante.

Los acontecimientos médicos importantes se definen como aquellos sucesos que pueden no ser inmediatamente potencialmente mortales o producir la muerte, hospitalización o discapacidad, pero que pueden poner en peligro al sujeto o requerir una intervención médica o quirúrgica para prevenir uno de los otros resultados enumerados anteriormente. Se debe ejercer el juicio médico y científico para decidir si un AA de este tipo debe considerarse grave.

Los acontecimientos **que no se consideran** AAG son hospitalizaciones por:

- un procedimiento convencional para la administración de terapia de protocolo. Sin embargo, la hospitalización u hospitalización prolongada por una complicación de la administración de la terapia se informará como AAG.
- el tratamiento de rutina o control de la indicación estudiada no asociado con ningún deterioro del estado.
- la administración de sangre o transfusión de plaquetas como tratamiento de rutina de la indicación estudiada. Sin embargo, la hospitalización u hospitalización prolongada debida a una complicación de dicha transfusión sigue siendo un AAG notificable.

- un procedimiento para investigaciones relacionadas con el protocolo/enfermedad (por ejemplo, cirugía, exploraciones, endoscopia, toma de muestras para pruebas de laboratorio, toma de muestras de la médula ósea). Sin embargo, la hospitalización u hospitalización prolongada debida a una complicación de dichos procedimientos sigue siendo un AAG notificable.

- la hospitalización u hospitalización prolongada debida a razones técnicas, prácticas o sociales, en ausencia de un AA.

- un procedimiento que está planificado (es decir, planificado antes del comienzo del tratamiento o estudio); se debe documentar en el documento fuente y el CRD. La hospitalización u hospitalización prolongada por una complicación sigue siendo un AAG notificable.

- un tratamiento electivo o un procedimiento electivo para una afección preexistente, sin relación con la indicación estudiada, que no ha empeorado desde el inicio.

- tratamiento ambulatorio de emergencia u observación que no acabe en la admisión, a menos que se cumpla con otros criterios de gravedad anteriores.

Si un AA se considera grave, deben completarse tanto la página/pantalla de AA del CRD como el formulario de informe de AAG.

Para cada AAG, el investigador proporcionará información sobre la gravedad, fechas de inicio y finalización, relación con el PI, acción tomada con respecto al PI y resultado.

Gravedad/Intensidad

Tanto para los AA como para los AAG, el investigador debe evaluar la gravedad/intensidad del acontecimiento. La gravedad/intensidad de los AA se calificará en función de los síntomas del sujeto según la menor versión activa en ese momento de los criterios terminológicos comunes para acontecimientos adversos (CTCAE, versión 4.0); http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_40

Los AA que no están definidos en los CTCAE deben evaluarse en cuanto a su gravedad/intensidad según la escala siguiente:

- Grado 1 = Leve - incomodidad transitoria o leve; sin limitación de la actividad; no requiere intervención/terapia médica
- Grado 2 = Moderado - limitación leve a moderada de la actividad, es posible que se necesite algo de ayuda; no requiere o requiere una mínima intervención/terapia médica
- Grado 3 = Intenso - limitación notable de la actividad, generalmente se requiere alguna ayuda; se requiere intervención/terapia médica, la hospitalización es posible
- Grado 4 = Potencialmente mortal - limitación extrema de la actividad, se requiere asistencia significativa; requiere intervención/terapia médica significativa, probable hospitalización o ingreso en centro de cuidados paliativos
- Grado 5 = Muerte - el acontecimiento produce la muerte]

El término "intenso" se suele utilizar para describir la intensidad de un acontecimiento específico (como en el infarto de miocardio leve, moderado o intenso); el acontecimiento en sí, sin embargo, puede tener un significado médico relativamente menor (tal como un dolor de cabeza intenso). Este criterio *no* es lo mismo que "grave", que se basa en el *resultado* del sujeto/acontecimiento o en criterios de *acción* asociados con acontecimientos que representan una amenaza para la vida o el funcionamiento de un sujeto.

La gravedad, no la intensidad, sirve como guía para definir las obligaciones reguladoras.

Causalidad

El investigador debe determinar la relación entre la administración del PI y la aparición de un AA/AAG como No sospechosa o Sospechosa, como se define a continuación:

No sospechosa: una relación casual del acontecimiento adverso con la administración de PI es **improbable o remota**, u otros medicamentos, intervenciones terapéuticas o condiciones subyacentes proporcionan una explicación suficiente para el acontecimiento observado.

Sospechosa: existe una **posibilidad razonable** de que la administración del PI haya provocado el acontecimiento adverso. "Posibilidad razonable" significa que hay evidencias que sugieren una relación causal entre el PI y el acontecimiento adverso.

5 La causalidad debe evaluarse y proporcionarse para cada AA/AAG en función de la información disponible en ese momento. La causalidad debe volverse a evaluar y proporcionarse a medida que se disponga de información adicional.

10 Si se considera que un acontecimiento es sospechoso de estar relacionado con un comparador, un auxiliar u otro CC-90011 que no ha sido fabricado o proporcionado por Celgene, se ha de proporcionar el nombre del fabricante al informar el acontecimiento.

Duración

15 Tanto para los AA como para los AAG, el investigador proporcionará un registro de las fechas de inicio y finalización del acontecimiento.

Acción tomada

20 El investigador informará la acción tomada con el PI como resultado de un AA o AAG, según corresponda (por ejemplo, suspensión, interrupción o reducción de la dosis del PI, según corresponda) e informará si se dieron tratamientos concomitantes y/o adicionales para el acontecimiento.

Resultado

25 El investigador informará el resultado del acontecimiento tanto para los AA como para los AAG.

30 Todos los AAG que no se hayan solucionado al suspender la participación del sujeto en el estudio deben recibir un seguimiento hasta que se recuperen (retornen al inicio), se recuperen con secuelas o se produzca la muerte (debido al AAG).

Un valor de laboratorio anómalo se considera un AA si la anomalía:

- produce la suspensión del estudio;
- 35 • requiere tratamiento, modificación/interrupción de la dosis del compuesto A, o cualquier otra intervención terapéutica; o
- se considera que tiene una importancia clínica significativa, por ejemplo, aquella que indique un nuevo proceso de enfermedad y/o toxicidad de órganos, o sea un agravamiento o empeoramiento de una afección existente.

40 Independientemente del grado de intensidad, solo las anomalías de laboratorio que cumplan con un criterio de gravedad deben documentarse como un acontecimiento adverso grave.

45 Si una anomalía de laboratorio es un componente de un diagnóstico o síndrome, entonces solo se deberá registrar el diagnóstico o el síndrome en la página/pantalla de AA del CRD. Si la anomalía no era parte de un diagnóstico o síndrome, entonces la anomalía de laboratorio debe registrarse como AA. Si es posible, la anomalía de laboratorio se debe registrar como un término médico y no simplemente como un resultado de laboratorio anómalo (por ejemplo, registrar trombocitopenia en lugar de número disminuido de plaquetas).

50 Todos los embarazos o sospechas de embarazo que ocurran en una mujer en edad fértil o en la pareja en edad fértil de un varón son acontecimientos que deben notificarse de inmediato. La exposición de cualquier mujer embarazada (por ejemplo, cuidadora, farmacéutica, coordinadora del estudio o monitora) a compuesto A también es un acontecimiento que debe informarse de inmediato.

55 Los embarazos y las sospechas de embarazo (que incluyen los niveles elevados de β -hCG o una prueba de embarazo positiva en una mujer de edad fértil, independientemente del estado de la enfermedad) que se produzcan mientras el sujeto esté tomando el compuesto A, o en el plazo de 90 desde la última dosis de compuesto A administrada al sujeto, se consideran acontecimientos de notificación inmediata. El producto en investigación debe suspenderse de inmediato. El embarazo, la sospecha de embarazo o la prueba de embarazo positiva se debe informar de inmediato al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene por correo electrónico, teléfono o fax, u otro método apropiado, usando el formulario de informe inicial de embarazo o un formulario equivalente aprobado.

65 La mujer debe ser derivada a un obstetra-ginecólogo, preferentemente uno con experiencia en toxicidad reproductiva para una evaluación y asesoramiento adicionales. El investigador realizará un seguimiento de la mujer hasta la finalización del embarazo y debe notificar de inmediato al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene el resultado del embarazo (ya sea un resultado normal o anómalo) mediante el formulario de informe de seguimiento

de embarazo o un formulario equivalente aprobado.

Si el resultado del embarazo fue anómalo (por ejemplo, aborto espontáneo), el investigador debe informar el resultado anómalo como un AA. Si el resultado anómalo cumple con alguno de los criterios de gravedad, se debe informar como un AAG al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene por fax u otro método apropiado, en el plazo de las 24 horas posteriores al conocimiento del acontecimiento por parte del investigador utilizando el formulario de informe de AAG o un formulario equivalente aprobado.

Se deben informar todos los fallecimientos neonatales ocurridos en los 28 días posteriores al nacimiento, independientemente de la causalidad, como AAG. Además, cualquier fallecimiento infantil posterior a los 28 días que el investigador sospeche que está relacionado con la exposición en el útero al compuesto A también se debe informar al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene por fax u otro método apropiado, en el plazo de las 24 horas posteriores al conocimiento del acontecimiento por parte del investigador utilizando el formulario de informe de AAG o un formulario equivalente aprobado.

Si la pareja femenina de un sujeto varón que toma el compuesto A que queda embarazada, el sujeto varón que toma el compuesto A debe notificarlo al investigador y se debe recomendar a la pareja embarazada que se ponga en contacto con su médico de inmediato. Cuando sea aplicable, puede ser necesario suspender el compuesto A en el sujeto varón, pero puede reanudarse más tarde a discreción del investigador y del monitor médico.

Cualquier AA que cumpla con cualquier criterio para un AAG requiere la cumplimentación de un formulario de informe de AAG, además del registro en la página/pantalla de AA del CRD. Todos los AAG se deben notificar al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene en el plazo de 24 horas después del conocimiento del acontecimiento por parte del investigador por fax u otro método apropiado (por ejemplo, por correo electrónico), utilizando el formulario de informe de AAG o un formulario equivalente aprobado. Esta instrucción se refiere a los informes de AAG iniciales, así como a cualquier informe de seguimiento.

Es necesario que el investigador se asegure de que los datos de estos formularios sean exactos y consistentes. Este requisito se aplica a todos los AAG (independientemente de la relación con el compuesto A) que se produzcan durante el estudio (desde el momento en que el sujeto firma el consentimiento informado hasta 28 días después de la última dosis del compuesto A) o cualquier AAG comunicado al investigador en cualquier momento a partir de entonces que se sospeche que está relacionado con el compuesto A. Se recopilarán los acontecimientos adversos graves que se produzcan antes del tratamiento (después de la firma del DCI).

El informe de AAG debe proporcionar una descripción detallada del AAG e incluir un sumario conciso de los registros del hospital y otros documentos relevantes. Si un sujeto murió y se realizó una autopsia, se deben enviar copias del informe de la autopsia y del certificado de defunción al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene tan pronto como estén disponibles. Todos los datos de seguimiento se deben detallar en un formulario de informe de AAG posterior, o formulario equivalente aprobado, y enviarse al departamento de seguridad de medicamentos de Celgene.

Cuando lo exija la legislación local, el investigador es responsable de informar al Comité ético de investigación clínica (CEIC) del AAG y proporcionarles toda la información inicial y de seguimiento relevante sobre el acontecimiento. El investigador debe mantener copias de toda la información sobre el AAG del archivo, incluyendo la correspondencia con el CEIC.

Las consultas relacionadas con el AAG se comunicarán desde el departamento de seguridad de medicamentos de Celgene al sitio por fax o correo electrónico. Se espera que el tiempo de respuesta no sea superior a cinco (5) días hábiles. Las consultas urgentes (por ejemplo, la ausencia de la evaluación de la causalidad) se pueden atender por teléfono.

A efectos de la presentación de informes reglamentarios, el departamento de seguridad de medicamentos de Celgene determinará la expectativa de los acontecimientos sospechosos de estar relacionados con el compuesto A en base al folleto del investigador.

En los Estados Unidos, todas las sospechas de reacciones adversas graves e imprevistas (SRAGI) se informarán de manera expedita según 21 CFR 312.32.]

Para los países de dentro del Espacio Económico Europeo (EEE), Celgene o su representante autorizado informarán de manera expedita a las autoridades reguladoras y los comités de ética correspondientes, las sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas (SRAGI) de conformidad con la directiva 2001/20/CE y las directrices detalladas sobre la recopilación, verificación y presentación de informes de reacciones adversas derivadas de ensayos clínicos sobre productos en investigación para uso humano (ENTR/CT3) y también según los requisitos específicos de cada país.

Los acontecimientos adversos tales como la progresión de la enfermedad, la muerte relacionada con la progresión de la enfermedad (en ausencia de acontecimientos graves relacionados con el compuesto A) y los acontecimientos

graves debido a la recaída de la indicación estudiada no estarán sujetos a informes expeditos por parte del patrocinador a las autoridades reguladoras.

Celgene o su representante autorizado notificará al investigador la información siguiente:

- Cualquier AA sospechoso de estar relacionado con el uso del compuesto A en su estudio o en otros estudios, que sea grave e inesperado (por ejemplo, SRAGI);
- Cualquier hallazgo de pruebas en animales de laboratorio que sugiera un riesgo significativo para los sujetos humanos, incluyendo los informes de mutagenicidad, teratogenicidad o carcinogenicidad.

Cuando lo exija la legislación local, el investigador deberá notificar a su CEIC con prontitud sobre estos nuevos AA graves e inesperados o riesgos significativos para los sujetos.

El investigador debe conservar copias de toda la información sobre seguridad pertinente del archivo, incluyendo la correspondencia con Celgene y el CEIC.

Suspensiones

Los acontecimientos siguientes se consideran razones suficientes para suspender a un sujeto del producto o productos en investigación:

- Acontecimiento adverso
- Retirada por parte del sujeto
- Falta de eficacia
- Decisión del médico
- Violación del protocolo
- Enfermedad progresiva
- Muerte
- Pérdida para el seguimiento
- Otro (a especificar en el CRD)

El motivo de la suspensión del tratamiento debe registrarse en el CRD y en los documentos fuente. En el caso de suspensión del tratamiento después de un acontecimiento adverso, se debe hacer el máximo esfuerzo para seguir a los sujetos durante 28 días después de la última dosis del compuesto A.

La decisión de suspender el tratamiento de un sujeto sigue siendo responsabilidad del médico tratante, que no será retrasada ni rechazada por el patrocinador. Sin embargo, antes de suspender a un sujeto, el investigador puede comunicarse con el monitor médico y enviarle los documentos de respaldo apropiados para su revisión y análisis.

Nota: Cualquier resultado de laboratorio, tal como neutropenia, trombocitopenia, otras anomalías, etc., que se considere clínicamente significativo, se debe seguir hasta que regrese al valor inicial o al grado 1.

Los acontecimientos siguientes se consideran razones suficientes para suspender a un sujeto del estudio:

- Descartado en el proceso de cribado
- Retirada por parte del sujeto
- Falta de eficacia
- Decisión del médico
- Violación del protocolo
- Enfermedad progresiva
- Muerte
- Pérdida para el seguimiento
- Otro (a especificar en el CRD)

El motivo de la suspensión del estudio debe registrarse en el CRD y en los documentos fuente.

Procedimientos de emergencia

En situaciones de emergencia, el investigador debe ponerse en contacto con el médico/médico monitor responsable del estudio del patrocinador o la persona designada, por teléfono en el número o números que figuran en la página de información del contacto de emergencia del protocolo (después de la página del título).

En el caso improbable en que no se pueda localizar al médico/monitor médico del estudio del patrocinador o la persona

designada, por favor, póngase en contacto con el centro de llamadas de emergencia global por teléfono al número que figura en la página de información del contacto de emergencia del protocolo (después de la página del título). Este centro de llamadas de emergencia global está disponible 24 horas al día 7 días a la semana. Los representantes son responsables de obtener la información de su llamada y de ponerse en contacto con Celgene/organización de monitor

Nota: El centro de llamadas de emergencia global de soporte de 24 horas solamente se debe usar si no se es capaz de localizar al médico o médicos del estudio del patrocinador, o al monitor médico o a la persona designada para las llamadas de emergencia.

Este es un estudio no enmascarado; por lo tanto, el compuesto A se identificará en el etiquetado del envase. Los sujetos incluidos en este estudio recibirán una tarjeta de identificación con el nombre del estudio y un número de contacto de emergencia. Los profesionales de la salud la pueden usar para buscar información de urgencia sobre la participación de un sujeto en el estudio.

Consideraciones reguladoras

Los procedimientos establecidos en este protocolo de estudio relacionados con la conducta, evaluación y documentación de este estudio están diseñados para asegurar que Celgene, su representante autorizado y el investigador cumplan con las buenas prácticas clínicas (BPC), como se describe en la directriz E6 de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) y de acuerdo con los principios éticos generales descritos en la Declaración de Helsinki. El estudio recibirá la aprobación de un CEIC antes de su comienzo. El investigador realizará todos los aspectos de este estudio según las leyes nacionales, estatales y locales de las autoridades reguladores pertinentes.

Las responsabilidades del investigador se establecen en la guía de buenas prácticas clínicas del ICH y en las reglamentaciones locales. El personal de Celgene o un representante autorizado evaluarán y aprobarán a todos los investigadores, que a su vez, seleccionan a su personal.

El investigador debe asegurarse de que todas las personas que ayuden en el estudio estén adecuadamente informadas sobre el protocolo, las modificaciones, los tratamientos del estudio, así como los deberes y funciones relacionados con el estudio, incluyendo las obligaciones de confidencialidad de la información a Celgene. El investigador debe mantener una lista de subinvestigadores y otras personas debidamente cualificadas en quienes él o ella haya delegado funciones significativas relacionadas con el estudio.

El investigador es responsable de mantener un registro de todos los sujetos que firmen un formulario de consentimiento informado (DCI) y que sean seleccionados para entrar en el estudio. Los sujetos que sean descartados en el cribado deben tener la o las razones registradas en los documentos fuente del sujeto.

El investigador, o un miembro designado del personal del investigador, debe estar disponible durante las visitas de control para revisar los datos, resolver consultas y permitir el acceso directo a los registros de los sujetos (por ejemplo, registros médicos, gráficos de consultorios, gráficos hospitalarios y gráficos relacionados con el estudio) para la verificación de los datos de origen. El investigador debe garantizar la finalización oportuna y precisa de los CRD y las consultas.

La información contenida en el protocolo y las modificaciones (con la excepción de la información proporcionada por Celgene en sitios web de registros públicos) se considera información confidencial de Celgene. El investigador o su institución solo puede divulgar libremente la información que previamente haya divulgado Celgene en un sitio web de registro público, o como se indique en el acuerdo del ensayo clínico. El protocolo de Celgene, las modificaciones y la información IB no se deben poner a disposición del público (por ejemplo en el sitio web del investigador o su institución) sin la aprobación expresa por escrito de Celgene. La información propuesta para su publicación en el sitio web del investigador o su institución se debe enviar a Celgene para su revisión y aprobación, proporcionando al menos 5 días hábiles para su revisión.

En el momento en que los resultados de este estudio estén disponibles para el público, Celgene proporcionará a los investigadores un resumen de los resultados escrito para personas no especializadas. El investigador es responsable de compartir estos resultados con el sujeto y/o su cuidador según lo acordado por el sujeto.

El investigador debe obtener el consentimiento informado de un sujeto y/o del representante legal de un sujeto antes de cualquier procedimiento relacionado con el estudio.

La documentación de que el consentimiento informado se produjo antes de la entrada del sujeto de estudio en el estudio y del proceso de consentimiento informado debe registrarse en los documentos fuente del sujeto del estudio, incluyendo la fecha. El DCI original firmado y fechado por el sujeto de estudio y por la persona que dio su consentimiento al sujeto del estudio antes de la entrada del sujeto de estudio en el estudio, se debe mantener en los archivos del estudio del investigador y se debe entregar una copia al sujeto del estudio. Además, si se modifica un protocolo y ello afecta al contenido del consentimiento informado, el DCI se debe revisar. Los sujetos del estudio que

participan en el estudio cuando se implementa el protocolo modificado deben volver a dar su consentimiento con la versión revisada del DCI. Se debe mantener en los archivos del estudio del investigador el DCI revisado, firmado y fechado por el sujeto de estudio y por la persona que dio su consentimiento al sujeto de estudio y se debe entregar una copia al sujeto de estudio.

5 Celgene afirma el derecho del sujeto a la protección contra la invasión de la privacidad y a cumplir con la ICH y otras regulaciones locales (la que sea más estricta). Celgene exige que el investigador permita a los representantes de Celgene y, cuando sea necesario, a los representantes de las autoridades reguladoras, revisar y/o copiar cualquier registro médico relevante para el estudio según las leyes locales.

10 Si el acceso directo a los registros médicos requiere una exención o autorización separada del DCI firmado por el sujeto, es responsabilidad del investigador obtener dicho permiso por escrito del individuo apropiado.

15 Cualquier modificación de este protocolo debe ser aprobada por el médico/monitor médico del estudio del patrocinador. Las modificaciones se enviarán al CEIC para su aprobación por escrito. Se debe obtener la aprobación por escrito antes de llevarse a cabo la aplicación de la versión modificada. La aprobación por escrito firmada por el CEIC debe hacer referencia específica al nombre del investigador, número de protocolo, título del estudio y número o números de modificaciones correspondientes. Las modificaciones que son de naturaleza administrativa no requieren la aprobación por parte del CEIC, pero se presentarán al CEIC con fines informativos.

20 En el caso de una modificación sustancial del estudio, la modificación correspondiente se enviará a la autoridad reguladora competente en cada país y no se aplicará hasta que se haya aprobado.

25 Antes del inicio del estudio, el protocolo de estudio, el DCI y cualquier otro documento apropiado, se enviará al CEIC con una carta de presentación o un formulario en el que se enumeran los documentos presentados, sus fechas de emisión y el lugar (o región o área de jurisdicción, según corresponda) para cuya aprobación se cumplen los requisitos legales locales.

30 Celgene o su representante autorizado solo puede proporcionar el PI a un investigador después de que Celgene o su representante autorizado hayan recibido la documentación sobre todos los requisitos éticos y legales para el inicio del estudio. Esta documentación también debe incluir una lista de los miembros del CEIC, y su ocupación y cualificación. Si el CEIC no revela los nombres, las ocupaciones y cualificaciones de los miembros del comité, se debe solicitar que emita una declaración que confirme que la composición del comité está de acuerdo con las BPC. Por ejemplo, el número de garantía general del CEIC puede aceptarse como sustituto de esta lista. La aprobación formal por parte del CEIC debe mencionar el título del protocolo, el número, el número de modificación (si corresponde), el sitio de estudio (o región o área de jurisdicción, según corresponda), y cualquier otro documento revisado. Debe mencionar la fecha en la que se tomó la decisión y debe estar firmada oficialmente por un miembro del comité. Antes de incluirse el primer sujeto en el estudio, se deben cumplir todos los requisitos éticos y legales.

40 El CEIC y, si procede, las autoridades, deben ser informados de todas las modificaciones posteriores del protocolo de acuerdo con los requisitos legales locales. Las modificaciones se deben evaluar para determinar si se debe buscar una aprobación formal y si también se debe revisar el DCI.

45 El investigador debe mantener un registro de todas las comunicaciones con el CEIC y, si procede, entre un investigador coordinador y el CEIC. Esta declaración también se aplica a cualquier comunicación entre el investigador (o el investigador coordinador, si corresponde) y las autoridades reguladoras.

Cualquier anuncio para reclutar sujetos para el estudio debe ser revidado por Celgene y el CEIC antes de usarlo.

50 Si lo requiere la legislación o el CEIC, el investigador debe presentar al CEIC:

- Información sobre los acontecimientos adversos graves o inesperados tan pronto como sea posible;
- Informes periódicos sobre el progreso del estudio;
- Desviaciones del protocolo o cualquier cosa que pueda implicar un riesgo añadido para los sujetos.

55 Celgene se reserva el derecho de terminar este estudio de manera prematura en cualquier momento por razones médicas o administrativas razonables. Cualquier suspensión prematura se documenta apropiadamente según los requisitos locales (por ejemplo, CEIC, autoridades reguladoras, etc).

60 Además, el investigador o Celgene tiene el derecho de suspender un solo sitio en cualquier momento durante el estudio por razones médica o administrativas tales como:

- Inclusión incorrecta;
- Incumplimiento de las BPC;

65

- Recopilación de datos inexactos o incompletos;
- Falsificación de registros;
- Incumplimiento del protocolo del estudio.

Manejo de datos y mantenimiento de los registros

- 10 El investigador debe asegurar que los registros y documentos relacionados con la realización del estudio y la distribución del producto de investigación sean completos, precisos, archivados y conservados. Los ejemplos de documentos fuente incluyen: registros hospitalarios; gráficos de ambulatorios y consultorios; notas de laboratorio; memorandos; diarios o listas de verificación de evaluación del sujeto; registros de dispensación; datos registrados de instrumentos automatizados; copias o transcripciones certificadas tras la verificación como copias exactas; microficha;
- 15 películas e informes de rayos X; y registros llevados en la farmacia y a los laboratorios, así como copias de CRD o CD-ROM.

- Los datos se recopilarán a través del CRD y se introducirán en la base de datos clínica según los PTN de Celgene. Estos datos se verificarán electrónicamente mediante el uso de verificaciones de edición programadas por el equipo clínico. Las discrepancias en los datos se notificarán al equipo clínico y al personal del sitio de investigación, si fuera necesario. Las resoluciones a estos problemas se reflejarán en la base de datos. Una pista de auditoría dentro del sistema rastrea todos los cambios realizados en los datos.

- 25 El investigador debe conservar los documentos esenciales de acuerdo con el período de tiempo establecido en el acuerdo del ensayo clínico. El investigador debe conservar estos documentos durante el período de tiempo descrito anteriormente, o de acuerdo con las leyes o requisitos locales, lo que sea más largo. Los documentos esenciales incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

- DCI firmados por todos los sujetos;
- Lista de códigos de identificación de los sujetos, Registro del cribado (si corresponde) y registro de la inclusión;
- Registro de todas las comunicaciones entre el investigador y el CEIC;
- Composición del CEIC;
- Registro de todas las comunicaciones entre el investigador, Celgene y su representante o representantes autorizados;
- Lista de subinvestigadores y otras personas debidamente cualificadas a quienes el investigador ha delegado funciones significativas relacionadas con el estudio, junto con sus roles en el estudio, *curriculum vitae* y sus firmas;
- Copias de los CRD (si están en papel) y de la documentación de las correcciones para todos los sujetos;
- Registros de rendición de cuentas del PI;
- Registro de fluidos corporales o muestras de tejido conservadas;
- Todos los demás documentos fuente (registros de sujetos, registros hospitalarios, registros de laboratorio, etc.);
- Todos los demás documentos enumerados en la sección 8 de la guía consolidada del ICH sobre BPC (Documentos esenciales para la realización de un ensayo clínico).

- 45 El investigador debe notificar a Celgene si desea asignar los documentos esenciales a alguien más, trasladarlos a otro lugar o si no puede conservarlos durante un período específico. El investigador debe obtener la aprobación por escrito de Celgene antes de la destrucción de cualquier registro. Si el investigador no puede cumplir con esta obligación, el investigador debe solicitar a Celgene el permiso para tomar medidas alternativas. Los detalles de estas medidas deben documentarse.

- 50 Todos los documentos del estudio deben estar disponibles si así lo requieren las autoridades sanitarias pertinentes. El investigador o la institución deben tomar medidas para evitar la destrucción accidental o prematura de estos documentos.

Control de calidad y garantía de calidad

- 55 Todos los aspectos del estudio serán cuidadosamente supervisados por Celgene o su representante autorizado para el cumplimiento de las reglamentaciones gubernamentales aplicables con respecto a las BPC y los PTN actuales.

- 60 Celgene se asegura de que se lleven a cabo los procedimientos de control adecuados antes, durante y después del estudio. Todos los aspectos del estudio se revisan con el investigador y el personal en una visita de inicio del estudio y/o en una reunión de investigadores. Antes de incluir a los sujetos en el estudio, un representante de Celgene revisará el protocolo, los CRD, los procedimientos para obtener el consentimiento informado, el mantenimiento de registros y los informes de AA/AAG con el investigador. El control incluirá las visitas *in situ* con el investigador y su personal, así como cualquier comunicación apropiada por correo, correo electrónico, fax o teléfono. Durante las visitas de

seguimiento, las instalaciones, el área de almacenamiento de productos en investigación, los CRD, los documentos origen del sujeto y el resto de documentación del estudio se inspeccionará/revisará por el representante de Celgene según el plan de seguimiento del estudio.

- 5 Se verificará la precisión realizando una verificación de datos que es una comparación directa de las entradas realizadas en los CRD con la documentación de origen apropiada. Cualquier discrepancia resultante se revisará con el investigador y/o su personal. Las correcciones necesarias se realizarán directamente en los CRD o mediante consultas por parte del investigador y/o su personal. Los procedimientos de control requieren que los consentimientos informados, el cumplimiento de los criterios de inclusión/exclusión y la documentación de los AAG y su registro
10 adecuado sean verificados. Las actividades de control adicionales pueden describirse en un plan de control específico del estudio.

- Además de los procedimientos de control de rutina, en Celgene existe una unidad de garantía de la calidad de las buenas prácticas clínicas. Los representantes de esta unidad llevarán a cabo auditorías de las actividades de
15 investigación clínica según los PTN de Celgene para evaluar el cumplimiento de las pautas y regulaciones de las buenas prácticas clínicas.

- El investigador está obligado a permitir el acceso directo a las instalaciones donde tuvo lugar el estudio, los documentos fuente, los CRD y registros de respaldo aplicables de la participación de los sujetos de estudio para
20 auditorías e inspecciones por parte del CEIC, las autoridades reguladores (por ejemplo, FDA, EMA, Health Canada) y representantes autorizados de la empresa. El investigador debe hacer todo lo posible para estar disponible para las auditorías y/o las inspecciones. Si alguna autoridad reguladora se pone en contacto con el investigador con respecto a una inspección, debe ponerse en contacto con Celgene inmediatamente.

25 *Publicaciones*

- Todo el protocolo e información referente a modificaciones, con la excepción de la información proporcionada por Celgene en los sitios web de registros públicos, se consideran información confidencial de Celgene y no para ser
30 usadas en ninguna publicación. La información relacionada con el protocolo de Celgene propuesta para su uso en una publicación se debe enviar a Celgene para su revisión y aprobación, y no se debe utilizar en una publicación sin la aprobación expresa por escrito de Celgene, o como se describe en el acuerdo de ensayo clínico.

- Celgene garantizará que los estudios patrocinados por Celgene se consideren para su publicación en la literatura científica en una revista revisada por expertos, independientemente de los resultados. Como mínimo, esto se aplica a
35 los resultados de todos los estudios clínicos en fase 3, y cualquier otro resultado de estudio de importancia médica significativa. Esto también incluye los resultados relacionados con medicamentos en investigación cuyos programas de desarrollo se hayan interrumpido.

- Los resultados de los estudios también se pueden presentar en uno o más congresos médicos y se pueden usar con
40 fines de intercambio científico o de enseñanza. Además, este estudio y sus resultados se pueden enviar para su inclusión en todos los registros de estudios de las autoridades sanitarias correspondientes, así como para su publicación en los sitios web de registros de estudios de las autoridades sanitarias, según lo exigen las normas de las autoridades sanitarias locales.

- La elegibilidad de la autoría, así como la selección de la primera autoría, se basará en varias consideraciones, que incluyen, pero no se limitan a, la contribución al desarrollo del protocolo, el reclutamiento del estudio, la calidad de los
45 datos, la participación en el análisis de datos, la participación en el comité directivo del estudio (cuando sea aplicable) y la contribución al resumen, la presentación y/o el desarrollo de publicaciones.

50 **Anexo A: Tabla de abreviaturas**

Abreviatura o término especializado	Explicación
AAF	Anticuerpos anti-fármaco
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AVD	Actividad de la Vida Diaria
AA	Acontecimiento Adverso
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
ALT	Alanina aminotransferasa (SGPT)
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
CAN	Cifra Absoluta de Neutrófilos
Ara-C	Citarabina
AST	Aspartato aminotransferasa (SGOT)
ABC	Área Bajo la Curva

(continuación)

Abreviatura o término especializado	Explicación
β -hCG	subunidad β de la gonadotropina coriónica humana
DVD	Dos veces al día
MO	Médula Ósea
IMC	Índice de masa corporal
BSA	Superficie corporal
BUN	Nitrógeno ureico sanguíneo
C	Ciclo
HC	Hemograma Completo
GD	Grupo de diferenciación
CEBP α (CCAAT/enhancer binding protein alpha)	CCAAT/proteína alfa de unión potenciadora
IC	Intervalo de confianza
c-Kit	Receptor del factor de crecimiento de mastocitos/células madre
CL	Aclaramiento
C _{máx}	Concentración plasmática máxima de fármaco
SNC	Sistema Nervioso Central
RC	Remisión completa
RCc	Remisión Completa citogenética
RCi	Remisión Completa con recuperación incompleta de neutrófilos
RCp	Remisión Completa con recuperación plaquetaria incompleta
CRP	Proteína C-reactiva
TRC	Tasa de Remisión Completa
CRO (Contract Research Organization)	Organización de investigación por contrato
CRD	Cuaderno de recogida de datos
CRP	Médico de investigación clínica
ICC	Investigador Científico Clínico
CRT	Calreticulina
TC	Tomografía computarizada
CTCAE	Criterios Terminológicos Comunes para Acontecimientos Adversos
% de CV	Coefficiente de variación
PAD	Prueba de Antiglobulina Directa
TCE	Tasa de Control de la Enfermedad
CID	Coagulación Intravascular Diseminada
TLD	Toxicidad Limitante de la Dosis
CSD	Comité de Seguimiento de Datos
DdR	Duración de la Respuesta
CE	Comité de Ética
ECG	Electrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
EF ECOG	Estado Funcional del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este
CRDe	Cuaderno de recogida de datos en soporte electrónico
AEE	Área Económica Europea
ELISA	Enzimoimmunoanálisis
Fdl	Fin de la Infusión
FdT	Fin del Tratamiento
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular
FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)	Clasificación de células activada por fluorescencia
MEF	Mujeres en Edad Fértil
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.
FISH	Hibridación <i>In Situ</i> con Fluorescencia
FLT3	Tirosina cinasa 3 relacionada con Fms
FLT3-ITD	Duplicación en tándem interna de tirosina cinasa 3 relacionada con Fms
FOXP3	Secuencia P3 de Forkhead

(continuación)

Abreviatura o término especializado	Explicación
BPC	Buenas Prácticas Clínicas
EICH	Enfermedad del injerto contra el hospedador
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
HGB	Hemoglobina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)	Antígeno leucocitario humano
DMNET	Dosis Más Alta No Extremadamente Tóxica
TCMH	Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas
huCD (<i>human Cluster of Differentiation</i>)	Grupo de diferenciación humano
DCI	Documento de Consentimiento Informado
FCI	Formulario de Consentimiento Informado
ICH	Conferencia internacional de armonización
ICSH (<i>International Council for Standardization in Hematology</i>)	Consejo internacional de normalización en hematología
IFN	Interferón
IgE	Inmunoglobulina de subclase E
IgG	Inmunoglobulina de subclase G
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IND	Producto en fase de investigación clínica
IIN	Índice internacional normalizado
PI	Producto en Investigación
IPSS-R (<i>Revised International Prognostic Index Scoring System</i>)	Sistema de puntuación del índice de pronóstico internacional revisado
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
RRI	Reacción Relacionada con la Infusión
TRI	Tecnología de Respuesta Interactiva
IV	Vía intravenosa
IGIV	InmunoGlobulina IntraVenosa
GIT	Grupo Internacional de Trabajo
KC-GRO (<i>Keratinocyte-derived Cytokine-Growth-Regulated Oncogene</i>)	Oncogén regulado por crecimiento de citocinas derivado de queratinocitos
LDH	Lactato deshidrogenasa
CML	Célula Madre Leucémica
FEVI	Fracción de expulsión del ventrículo izquierdo
RCm	Remisión Completa molecular
MCP-1	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
RMF	Resistencia a Múltiples Fármacos
SMD	Síndrome Mielodisplásico
MedDRA (<i>Medical Dictionary for Regulatory Activities</i>)	Diccionario médico para actividades de registro farmacéutico
MIP-1 α	Proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos
MM	Mieloma Múltiple
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DMT	Dosis Máxima Tolerada
MUGA (<i>multi-gated acquisition</i>)	Ventriculografía nuclear
N	Número
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
LNH	Linfoma no hodgkiniano
NOD-SCID	diabético(a) no obeso(a) (<i>Non-obese diabetic</i>), inmunodeficiencia combinada grave (<i>severe-combine immunodeficiency</i>)
NOAEL	Nivel Sin Efecto Adverso Observado
NOEL	Nivel Sin Efecto Observado
NPM1	Nucleofosmina 1

(continuación)

Abreviatura o término especializado	Explicación
NSG	Diabético(a) no obeso(a), inmunodeficiencia combinada grave gamma
DNT	Dosis No Tolerada
O ₂	Oxígeno
TRO	Tasa de Respuesta Objetiva
SG	Supervivencia global
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
FD	Farmacodinámica
SSP	Supervivencia sin progresión
FC	Farmacocinética
PLT	Plaqueta
RP	Remisión Parcial
TP	Tiempo de protrombina
TTP	Tiempo de Tromboplastina Parcial
CDS	Cada dos semanas
UVD	Una vez al día
UVS	Una vez a la semana
UVSx2	Una vez a la semana durante dos semanas
UVSx4	Una vez a la semana durante cuatro semanas
AREB	Anemia Resistente con Exceso de Blastocitos
CGR	Cifra de glóbulos rojos
SSR	Supervivencia Sin Recaída
DRF2	Dosis Recomendada para la Fase 2
AAG	Acontecimiento adverso grave
PAE	Plan de Análisis Estadístico
CD	Comité Directivo
DE	Desviación estándar
EE	Error estándar
SGOT	Transaminasa Glutámico Oxalacética Sérica
SGPT	Transaminasa Glutámico Pirúvica Sérica
SIRPα (<i>Signal-regulatory protein alpha</i>)	Proteína alfa reguladora de señales
PTN	Procedimiento de Trabajo Normalizado
CRS	Comité de revisión científica
SRAGI	Sospecha de Reacción Adversa Grave e Imprevista
t _{1/2}	Semivida
t _{máx}	Tiempo hasta la concentración plasmática máxima
SLT	Síndrome de Lisis Tumoral
CMTN	Cáncer de Mama Triple Negativo
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
LSN	Límite superior de la normalidad
EE.UU.	Estados Unidos
USP	Farmacopea de Estados Unidos
V _{ss}	Volumen de distribución
GB	Cifra de Leucocitos
OMS	Organización Mundial de la Salud
Sems	Semanas

Anexo B: RECIST Versión 1.1

5 La siguiente información está extraída/resumida de Eisenhauer, 2009, "New Response Evaluation Criteria in Solid Tumors: Revised RECIST guideline"(versión 1.1). Véase la referencia principal para obtener más información.

Definiciones

En la exploración, las lesiones tumorales/los ganglios linfáticos se clasifican como medibles o no medibles.

Enfermedad medible

Lesiones tumorales. Debe medirse con precisión en al menos una dimensión (debe registrarse el diámetro más largo en el plano de medición) con un tamaño mínimo de:

- 10 mm por TC (grosor del corte de la tomografía computarizada no superior a 5 mm)
- medición con calibrador de 10 mm mediante examen clínico (las lesiones que no se pueden medir con precisión con calibradores deben registrarse como no medibles)
- 20 mm por radiografía de tórax

Ganglios linfáticos malignos: Para ser considerado patológicamente agrandado y medible, un ganglio linfático debe ser ≥ 15 mm en el eje corto cuando se evalúa mediante una TC (se recomienda que el grosor del corte de la TC no supere los 5 mm). Al inicio del estudio y en el seguimiento, solo se medirá y se seguirá el eje corto.

Enfermedad no medible

Todas las demás lesiones, incluyendo lesiones pequeñas (diámetro más largo < 10 mm o los ganglios linfáticos patológicos con ≥ 10 a < 15 mm de eje corto), así como lesiones verdaderamente no medibles. Las lesiones consideradas verdaderamente no medibles incluyen: enfermedad leptomeníngea, ascitis, derrame pleural o pericárdico, enfermedad inflamatoria de las mamas, afectación linfangítica de piel o pulmón, masas abdominales/organomegalia abdominal identificados mediante exploración física que no se pueden medir mediante técnicas de imagen reproducibles.

Evaluación de la respuesta tumoral

Lesiones diana: Cuando hay más de una lesión tumoral medible en el momento basal, todas las lesiones hasta un máximo de cinco lesiones en total (y un máximo de 2 lesiones por órgano) representativas de todos los órganos afectados deben identificarse como lesiones diana, y se registrarán y medirán en el momento basal. Las lesiones diana se deben seleccionar en función de su tamaño (lesiones con el diámetro más largo), ser representativas de todos los órganos implicados, pero además deben ser aquellas que se prestan a mediciones repetidas reproducibles. Cabe señalar que los ganglios patológicos deben cumplir con el criterio medible de un eje corto de ≥ 15 mm mediante TC, y solo el eje corto de estos ganglios contribuirá a la suma basal. Todos los demás ganglios patológicos (aquellos con eje corto ≥ 10 mm, pero < 15 mm) deben considerarse lesiones no diana. Los ganglios que tienen un eje corto < 10 mm se consideran no patológicos y no deben registrarse ni recibir seguimiento. En el punto de partida, se debe registrar la suma de las lesiones diana (el diámetro más largo de las lesiones tumorales más el eje corto de los ganglios linfáticos: un máximo total de 5).

Después del momento inicial, se debe proporcionar un valor en el CRDe de todas las lesiones diana identificadas en cada evaluación, aunque sean muy pequeñas. Si no se pueden medir con precisión las lesiones extremadamente pequeñas y tenues, pero se considera que están presentes, se puede utilizar un valor predeterminado de 5 mm. Si las lesiones son demasiado pequeñas para medirlas y, de hecho, se cree que están ausentes, se puede utilizar un valor predeterminado de 0 mm.

Lesiones no diana: Todas las lesiones no medibles (o sitios de enfermedad) más cualquier lesión medible por encima de las enumeradas como lesiones diana se consideran lesiones no diana. No se requieren mediciones, pero estas lesiones deben anotarse en el momento inicial y deben recibir seguimiento como "presentes", "ausentes", o "progresión inequívoca".

Criterios de respuesta: Se evalúa la respuesta de las lesiones diana y no diana por separado y, a continuación, se evalúa la carga tumoral en su conjunto como respuesta global.

Respuesta de las lesiones diana: Las lesiones diana se evalúan de la siguiente manera:

- Respuesta Completa (RC). Desaparición de todas las lesiones diana. Cualquier ganglio linfático patológico (ya sea o no diana) debe tener una reducción en el eje corto de < 10 mm.
- Respuesta Parcial (RP). Una disminución de al menos un 30 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de los diámetros en el momento inicial.
- Enfermedad progresiva (EP). Una disminución de al menos un 20 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana, tomando como referencia la suma más pequeña del estudio (esto incluye si la suma en el momento inicial es la más pequeña del estudio). Además del aumento relativo del 20 %, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm. (Observación: la aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión).
- Enfermedad estable (EE). Ni reducción suficiente para calificarla como RP ni aumento suficiente para calificarla como EP, tomando como referencia la suma más pequeña de los diámetros durante el estudio.

Respuesta de lesiones no diana: Las lesiones no diana se evaluarán de la siguiente manera:

- Respuesta Completa (RC). Desaparición de todas las lesiones no diana y normalización del nivel de marcadores tumorales. Todos los ganglios linfáticos deben tener un tamaño no patológico (eje corto <10 mm).
- 5 • Sin RC/Sin EP. Persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento del nivel del marcador tumoral por encima de los límites normales.
- Enfermedad progresiva (EP). Progresión inequívoca (véanse los comentarios a continuación) de las lesiones no diana existentes. (Observación: la aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión).
- 10 Cuando el sujeto también tiene una enfermedad medible: En esta configuración, para lograr una "progresión inequívoca" basándose en la enfermedad no diana, debe haber un nivel global de empeoramiento sustancial en la enfermedad no diana tal que, incluso en presencia de EE o RP en la enfermedad diana, la carga global del tumor ha aumentado lo suficiente como para justificar la suspensión del tratamiento. Un "aumento" moderado en el tamaño de una o más lesiones no diana generalmente no es suficiente para la calificación de un estado de progresión inequívoco.
- 15 Por lo tanto, la designación de la progresión global basándose únicamente en el cambio de la enfermedad no diana frente a EE o RP de la enfermedad diana, será extremadamente rara.

- Cuando el sujeto tiene únicamente una enfermedad no medible: Esta circunstancia se da en algunos ensayos de Fase 3 cuando no es un criterio de entrada al estudio tener una enfermedad medible. Los mismos conceptos generales se aplican en el presente documento como se ha indicado anteriormente; sin embargo, en este caso, no hay una evaluación de la enfermedad medible que se tenga en cuenta en la interpretación de un aumento en la carga de enfermedad no medible. Dado que el empeoramiento de la enfermedad no diana no se puede cuantificar fácilmente (por definición: si todas las lesiones son verdaderamente no medibles), una prueba útil que se puede aplicar al evaluar los sujetos para la progresión inequívoca es considerar que el aumento en la carga de enfermedad global basado en el cambio de la enfermedad no medible es de una magnitud comparable al aumento que sería necesario para declarar la EP para la enfermedad medible: es decir, un aumento en la carga tumoral que representa un aumento adicional del 73 % en el "volumen" (lo que equivale a un aumento del 20 % en el diámetro de una lesión medible). Los ejemplos incluyen un aumento en un derrame pleural de "pequeño" a "grande", un aumento en la enfermedad linfagítica de localizada a generalizada, o puede describirse en los protocolos como "suficiente para requerir un cambio en la terapia". Si se observa una "progresión inequívoca", se debe considerar que el sujeto ha tenido EP global en ese momento. Si bien sería ideal tener criterios objetivos para aplicar a enfermedades no medibles, la propia naturaleza de esa enfermedad hace que sea imposible hacerlo: por lo tanto, el aumento debe ser sustancial.

- Respuesta global: La respuesta global debe evaluarse de acuerdo con la Tabla A en el caso de sujetos con lesiones diana y con la Tabla B en el caso de sujetos con solo lesiones no diana.

Tabla A: Respuesta de punto temporal: Sujetos con enfermedad diana (± No Diana)

Respuesta de las lesiones diana	Respuesta de lesiones no diana	Lesiones nuevas	Respuesta global
RC	RC	No	RC
RC	Sin RC/ Sin EP	No	RP
RC	No evaluado	No	RP
RP	Sin EP o no evaluada por completo	No	RP
EE	Sin EP o no evaluada por completo	No	EE
No evaluada por completo	Sin EP	No	NE
EP	Cualquiera	Sí o No	EP
Cualquiera	EP	Sí o No	EP
Cualquiera	Cualquiera	Sí	FD

RC = Respuesta Completa, RP = Respuesta Parcial, EE = Enfermedad Estable, EP = Enfermedad Progresiva, NE = No Evaluable.

Tabla B: Respuesta de punto temporal: Sujetos solo con enfermedad no diana

Respuesta de las lesiones no diana	Lesiones nuevas	Respuesta global
RC	No	RC
Sin RC/ Sin EP	No	Sin RC/ Sin EP ⁱ⁾
No evaluada por completo	No	NE
EP inequívoca	Sí o No	EP

(continuación)

Respuesta de las lesiones no diana	Lesiones nuevas	Respuesta global
Cualquiera	Sí	EP
RC = Respuesta Completa, RP = Respuesta Parcial, EE = Enfermedad Estable, EP = Enfermedad Progresiva, NE = No Evaluable. ^a Se prefiere sin RC/sin EP" frente a "enfermedad estable" para la enfermedad no diana, ya que la EP se utiliza cada vez más como criterio de valoración para la evaluación de la eficacia en algunos ensayos, por lo que no se recomienda asignar esta categoría cuando no se pueden medir las lesiones.		

Deterioro sintomático

- 5 Los sujetos con un deterioro global del estado de salud que requieran la interrupción del tratamiento sin prueba objetiva de progresión de la enfermedad en ese momento, deben notificarse como "deterioro sintomático". Se debe hacer todo lo posible para documentar la progresión objetiva, incluso después de la interrupción del tratamiento. El deterioro sintomático no es un descriptor de una respuesta objetiva: es una razón para detener la terapia de estudio. El estado de respuesta objetivo de tales sujetos se determinará mediante la evaluación de la enfermedad diana y no diana.

10

Apéndice C: Criterios de respuesta revisados para el linfoma maligno

Se puede acceder en línea a los criterios de respuesta revisados por el grupo de trabajo Internacional para el linfoma maligno (Cheson, 2007) en: <http://jco.ascopubs.org/cgi/reprint/25/5/579>

15

Anexo D: Criterios de estado funcional

Tabla 37. Estado Funcional del Grupo Oncológico Cooperativo de la Costa Este (ECOG)

Puntuación	Descripción
0	Totalmente activo, capaz de llevar a cabo toda la función previa a la enfermedad sin restricciones
1	Actividad físicamente extenuante restringida, pero ambulatorio y capaz de realizar trabajos de naturaleza ligera o sedentaria, por ejemplo, pequeñas tareas domésticas, trabajo de oficina.
2	Ambulatorio y capaz de cuidar de sí mismo, pero incapaz de realizar cualquier actividad laboral. Despierto y aproximadamente más del 50 % de las horas de vigilia.
3	Capaz de cuidar de sí mismo de manera limitada, confinado en cama o silla más del 50% de las horas de vigilia.
4	Completamente inhabilitado. Incapaz de cuidar de sí mismo. Totalmente confinado en cama o silla
5	Muerte

20 Anexo E: Características del modelo de regresión logística bayesiana

En este estudio se utilizará un modelo de regresión logística bayesiana (MRLB, Neuenschwander, et al., 1998) adaptativa para el aumento escalonado de la dosis con control de sobredosis (Babb, 1988) para guiar el aumento escalonado.

25

El propósito de este anexo es presentar parámetros de rendimiento (características operativas) que ilustren la precisión del diseño al estimar la DMT bajo varias relaciones entre dosis y toxicidad a través de simulación informática. Adicionalmente, se proporcionan recomendaciones del siguiente nivel de dosis por el MRLB con el principio de control de sobredosis bajo diferentes escenarios de resultados hipotéticos en cohortes tempranas (suponiendo exactamente 3 pacientes evaluables en cada cohorte para simplificar) para mostrar cómo facilita las decisiones sobre el aumento escalonado de la dosis en estudio.

30

Especificaciones y resultados del estudio de simulación

- 35 Esta sección presenta las características operativas que ilustran la precisión del diseño en la estimación de la DTM bajo varias supuestas relaciones de dosis-toxicidad verdaderas.

Se realizan simulaciones para el MRLB en un total de 5 escenarios de relación dosis verdadera-TLD (consulte la Tabla 38):

40

1. La relación entre la dosis y la TLD es una curva pronunciada y la DMT se alcanza al nivel de dosis inicial (SE).
2. La relación entre la dosis y la TLD es una curva pronunciada y la DMT se alcanza al nivel de dosis medio (SM).
3. La relación entre la dosis y la TLD es una curva pronunciada y la DMT se alcanza al nivel de dosis final (SL).
4. La relación entre la dosis y la TLD es una curva plana y la DMT se alcanza al nivel de dosis medio (FM).
5. La relación entre la dosis y la TLD es una curva plana y la DMT se alcanza al nivel de dosis final (FL).

45

Tabla 38: P(TLD) de cinco escenarios simulados con números en gris que indican dosis con P(TLD) verdadera dentro del intervalo de toxicidad diana [16 %, 33 %]

Escenario	P(TLD) a diferentes niveles de dosis (mg)							
	1,25	2,5	5	10	15	22,5	30	37,5
SE	0,091	0,1699	0,2951	0,4613	0,5655	0,6642	0,7269	0,7702
SM	0,0113	0,031	0,0827	0,2022	0,317	0,4594	0,5663	0,6455
SL	0	0,0002	0,0018	0,0155	0,0522	0,1618	0,3196	0,4836
FM	0,0513	0,0867	0,1428	0,2263	0,289	0,361	0,4165	0,4611
FL	0,0009	0,0033	0,0121	0,0438	0,09	0,176	0,2694	0,3603

Las características operativas se revisan para investigar el rendimiento global del MRLB en cada escenario real. La Tabla 39 resume los resultados de las simulaciones realizadas.

Tabla 39: Resumen de parámetros de simulación para el MRLB y comparación con 3+3

Escenario/Método	Número medio de sujetos	Proporción de sujetos con TLD	Probabilidad de recomendar una dosis con P(TLD) verdadera		
			0,16-0,33	≥0,33	<0,16
SE, N-CRM	19,75	0,24	0,80	0,06	0,14
SE, 3+3	14,72	0,24	0,63	0,06	0,31
PM, N-CRM	22,50	0,16	0,72	0,06	0,22
PM, 3+3	20,48	0,16	0,55	0,05	0,40
SL, N-CRM	25,55	0,11	0,75	0,08	0,18
SL, 3+3	26,85	0,11	0,68	0,08	0,24
PLM, N-CRM	22,24	0,17	0,48	0,08	0,44
PLM, 3+3	20,38	0,18	0,37	0,10	0,52
FL, N-CRM	25,66	0,10	0,57	0,16	0,27
FL, 3+3	26,80	0,11	0,51	0,16	0,33

En general, el MRLB especificado con anterioridad está funcionando razonablemente. Con un tamaño de muestra similar o un poco mayor, el MRLB puede seleccionar la DMT en el intervalo diana con mayor probabilidad, especialmente para los escenarios 1, 2 y 4.

Además de las características operativas globales estudiadas anteriormente, el diseño debe tomar decisiones razonables durante un estudio basándose en las toxicidades observadas. Una vez completada una cohorte dada, la decisión de aumentar escalonadamente la dosis y la dosis real escogida para la siguiente cohorte dependerán de la recomendación del MRLB según el principio AECCS y la revisión médica de los datos clínicos y de laboratorio disponibles.

En la Tabla 40, se enumeran algunos escenarios para ilustrar el aumento escalonado de la dosis hasta la tercera cohorte de dosis utilizando el MRLB de 2 parámetros. Se supone que cada cohorte tiene exactamente 3 pacientes evaluables.

Tabla 40: Posibles escenarios hasta la tercera cohorte de dosificación con tres sujetos por cohorte

Escenario	Antecedentes de dosis (mg)	Número de TLD/Número de sujetos	Siguiente dosis por N-CRM(mg)
1	1,25	0/3	2,5
2	1,25	0/3	2,5
	2,5	0/3	5
3	1,25	0/3	2,5
	2,5	1/3	2,5
4	1,25	0/3	2,5
	2,5	2/3	1,25
5	1,25	0/3	2,5
	2,5	0/3	5
	5	0/3	10

(continuación)

Escenario	Antecedentes de dosis (mg)	Número de TLD/Número de sujetos	Siguiente dosis por N-CRM(mg)
6	1,25	0/3	2,5
	2,5	0/3	5
7	1,25	0/3	2,5
	2,5	0/3	5
8	1,25	0/3	2,5
	2,5	1/3	2,5
9	1,25	0/3	2,5
	2,5	1/3	2,5
10	1,25	0/3	2,5
	2,5	2/3	1,25
11	1,25	0/3	2,5
	2,5	2/3	1,25

Una vez más, el MRLB funciona razonablemente para los escenarios hipotéticos de aumento de dosis. El Modelo de Regresión Logística Bayesiana nos permite incorporar la información preclínica, así como actualizar la dosis recomendada en basándose en todos los datos de seguridad del estudio. Revisando los parámetros presentados en la tabla, se puede observar que el modelo no es sensible a diferentes escenarios de verdad. En general, este modelo es conservador debido al criterio de control de sobredosis. En todos los escenarios, la probabilidad de recomendar una dosis que sea excesivamente tóxica con una P(TLD) verdadera $\geq 33\%$ es mucho menor que la de recomendar una dosis con una P(TLD) verdadera entre 16 % y 33 % como DTM. Las recomendaciones sobre el estudio basadas en el modelo coinciden con el proceso de toma de decisiones clínicas, y deben considerarse junto con otra información clínica disponible por parte del equipo de ensayo clínico de Celgene y los investigadores del estudio al decidir los niveles de dosis que se probarán para determinar la DMT.

Anexo F: Recomendaciones para gestionar la diarrea inducida por el tratamiento

Las directrices publicadas (Benson, 2004) proporcionadas en la Figura 38 se modificaron para que coincidiesen con las del protocolo del estudio.

Anexo G: Gestión de muestras biológicas

Este es un anexo al Manual de Laboratorio.

Manipulación y conservación de las muestras

Todas las muestras de sangre y tejido recogidas para la investigación de biomarcadores y genética como parte de este estudio que no se agoten tras el análisis se conservarán para su uso en investigación durante un máximo de 5 años tras la finalización del estudio. Con el consentimiento del sujeto, el período de conservación se prolongará hasta 20 años después de que haya finalizado el estudio para su uso en investigaciones futuras para saber más sobre el cáncer y otras enfermedades. Las muestras se conservarán en una instalación de laboratorio segura diseñada para la conservación prolongada de muestras, con sistemas adecuados de control de acceso, supervisión y copia de seguridad.

Codificación de las muestras

Todas las muestras de biomarcadores y de investigación genética se identificarán únicamente mediante un código (número de identificación del sujeto). Estas muestras no llevarán ninguna otra información personal. El médico del estudio conservará la clave del código. Las muestras y la clave de código se mantendrán confidenciales y separadas. Los investigadores que realicen pruebas en las muestras solo verán el código y no verán ninguna información que identifique específicamente al sujeto.

Investigación sobre muestras de sangre y tejidos

El laboratorio promotor o las empresas contratadas por el laboratorio promotor analizarán muestras de investigación genética y de biomarcadores para su uso en investigaciones futuras para aprender más sobre el cáncer y otras enfermedades. Esto incluye determinar si los biomarcadores de células sanguíneas o células tumorales demuestran que el Compuesto A es biológicamente activo.

Informes y disponibilidad de biomarcadores y resultados genéticos

Los resultados de las pruebas de muestras de investigación genética y de biomarcadores no se compartirán con el sujeto, las empresas de seguros ni ningún otro tercero que no participe en el análisis de muestras descrito anteriormente. Los resultados no se archivarán en los antecedentes clínicos del sujeto. Los resultados de las pruebas son solo para fines de investigación y no se utilizarán para tomar decisiones sobre la atención médica de rutina de un sujeto.

No se mencionarán los nombres e identificadores de los sujetos en publicaciones o informes, minimizando así la posibilidad de riesgos psicológicos o sociales que pudieran derivarse del conocimiento de este biomarcador e información genética, tales como el riesgo de empleabilidad o asegurabilidad o el riesgo de discriminación.

Mecanismo para solicitar la destrucción de muestras tras la retirada del consentimiento

Si los sujetos retiran su consentimiento para participar en el estudio, adicionalmente, pueden solicitar que se destruyan sus muestras de biomarcadores y de investigación genética. En tales casos, un sujeto informará al médico del estudio que se ha retirado el consentimiento y solicitará la destrucción de cualquier muestra conservada no utilizada. El laboratorio promotor destruirá todas las muestras no utilizadas. Sin embargo, si las muestras se analizaron antes de retirar el consentimiento, entonces el laboratorio promotor puede seguir utilizando los datos ya disponibles.

Si los sujetos aceptan permitir que las muestras de biomarcadores y de investigación genética se conserven durante 20 años para futuras investigaciones, también son libres de revocar esa decisión en cualquier momento. El sujeto informará al médico del estudio que se ha retirado el permiso para que las muestras se utilicen en futuras investigaciones. El laboratorio promotor destruirá todas las muestras no utilizadas. Sin embargo, si las muestras se analizaron antes de retirar el consentimiento, entonces el laboratorio promotor puede seguir utilizando los datos ya disponibles.

Anexo H: Clasificación de Child-Pugh

Los sujetos con una clasificación Child-Pugh A sin encefalopatía hepática cumplen con este criterio de inclusión individual para el estudio.

Tabla 41: Clasificación de Child-Pugh

	1 punto	2 puntos	3 puntos
Bilirrubina (mg/dl)	< 2	2-3	>3
Albúmina (g/l)	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Tiempo de protrombina prolongado en segundos (IIN)	1-4 (<1,7)	4-6 (1,7-2,3)	>6 (>2,3)
Ascitis	Ninguna	Leve	Moderada
Encefalopatía hepática	Ninguna	Grado 1-2	Grado 3-4
Child A: 5-6 puntos; Child B: 7-9 puntos; Child C: ≥ 10 puntos			
Fuente: Pugh, 1973.			
IIN = Índice Internacional Normalizado.			

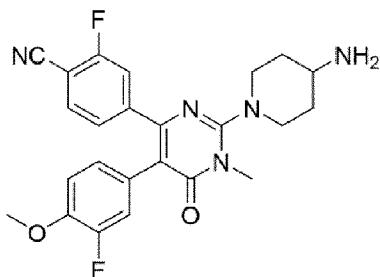
Anexo J: Grupo de trabajo de ensayos clínicos sobre cáncer de próstata (PCWG23, *Prostate Cancer Clinical Trials Working Group*)

Se puede acceder en línea a las recomendaciones del PCWG23 sobre el diseño y los criterios de valoración de ensayos clínicos para pacientes con cáncer de próstata progresivo y niveles de castración de testosterona (Scher, 2008/2016) en: <http://jco.ascopubs.org/content/34/12/1402>

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de carcinoma de células de Merkel humano, en donde el compuesto tiene la estructura

5



2. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto está adaptado para administración oral.

10

3. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el compuesto está en forma de un comprimido, píldora, sobre o cápsula de gelatina dura o blanda.

15

4. El compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso de la reivindicación 3, en donde el compuesto está en forma de una cápsula que contiene el compuesto con concentraciones de dosis que comprenden 0,50 mg, 0,75 mg o 2,00 mg.

FIG. 1

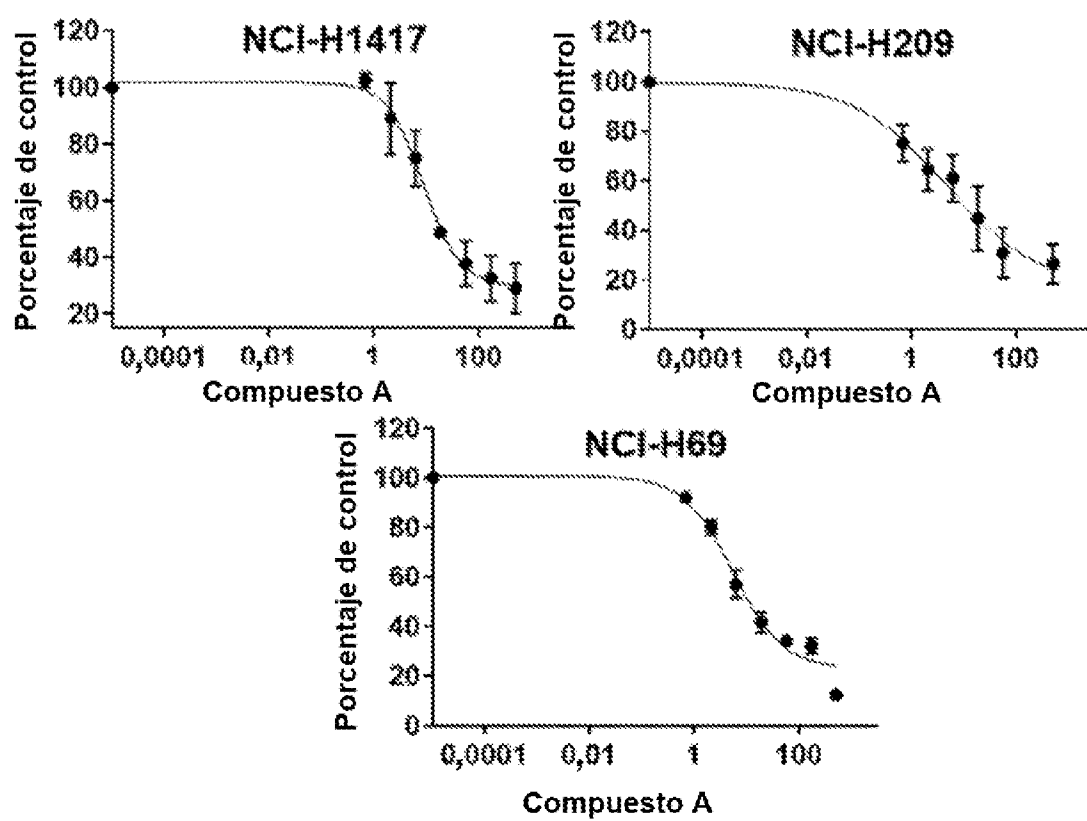


FIG. 2

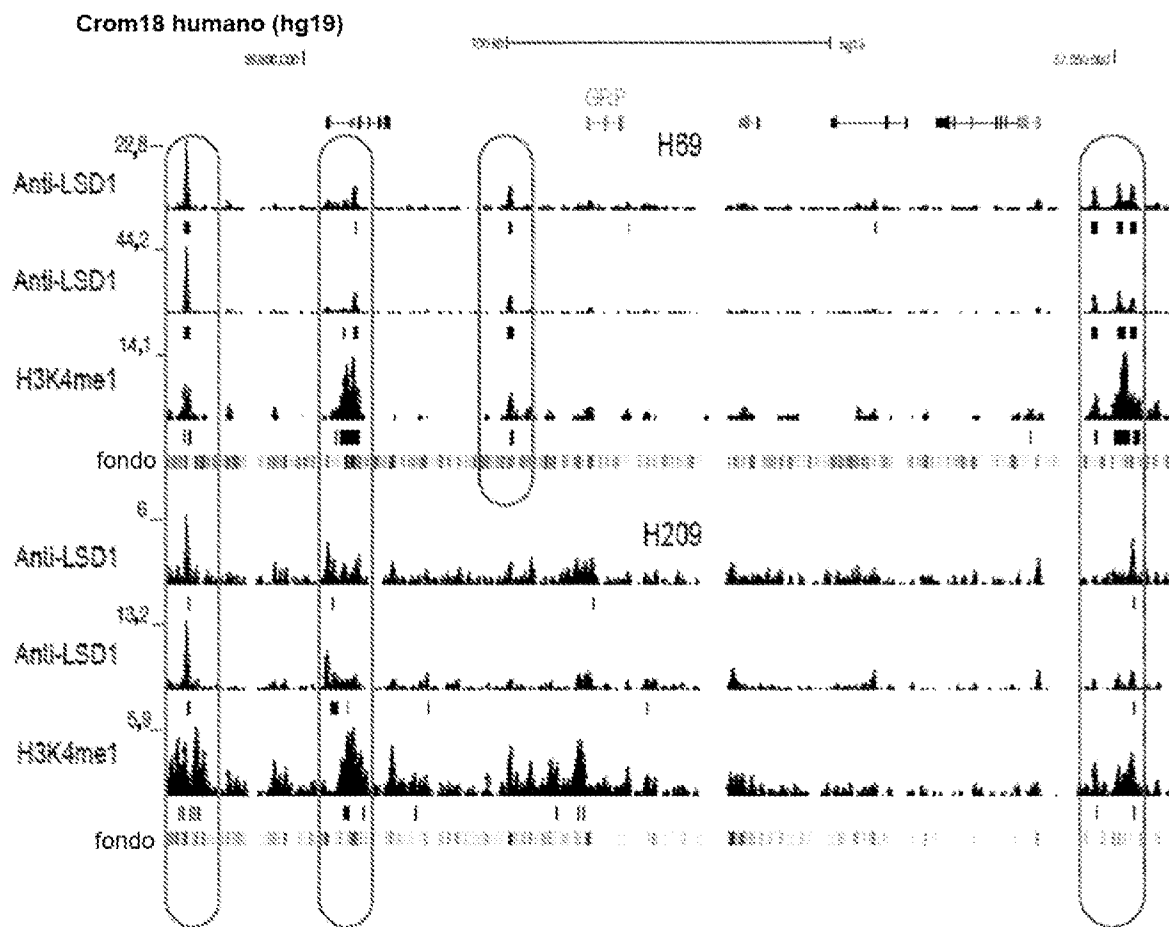


FIG. 3

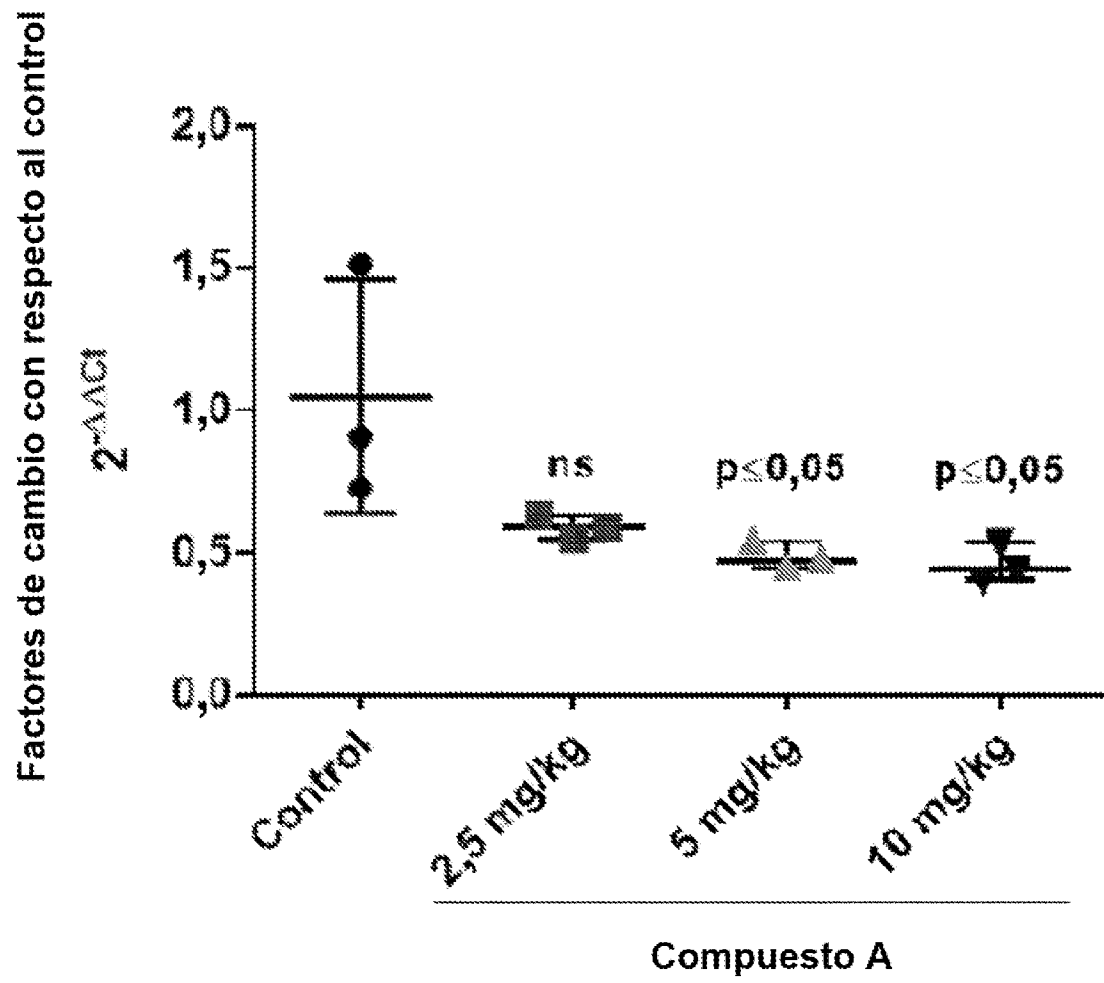


FIG. 4

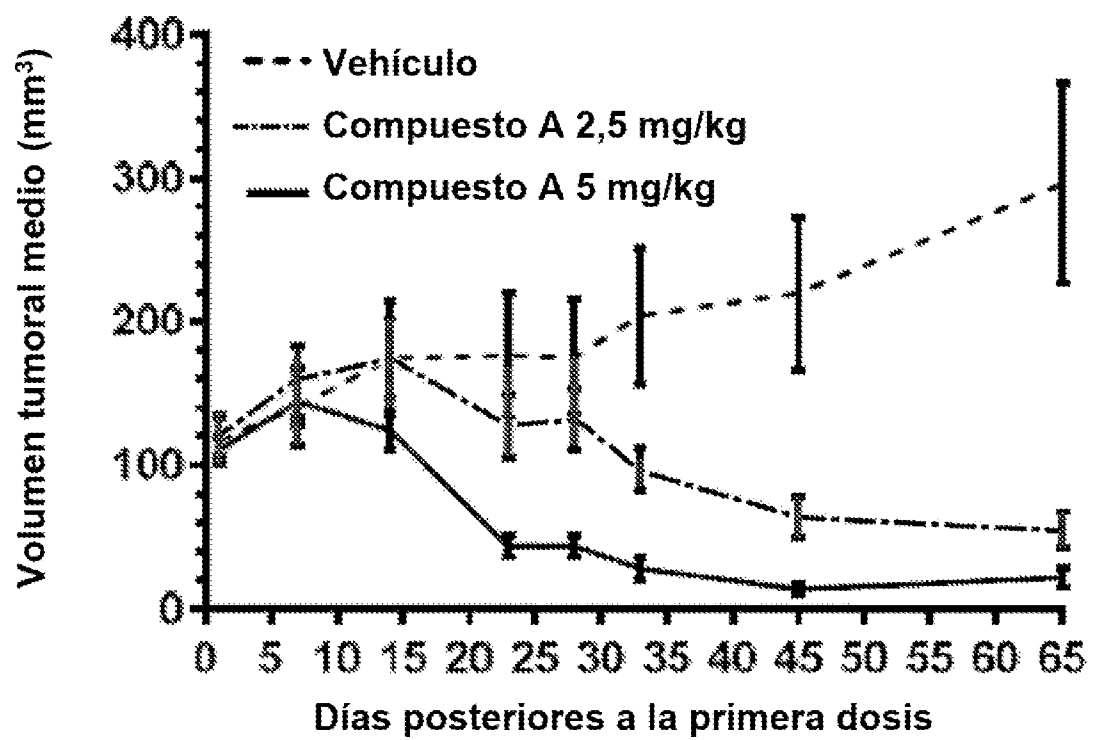
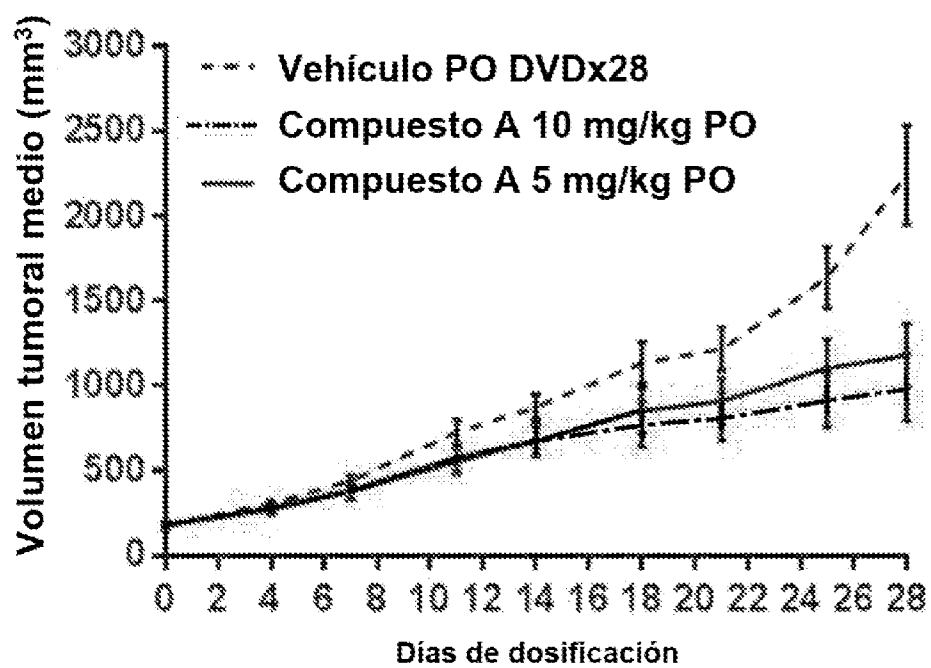


FIG. 5



Los volúmenes tumorales se representan como media \pm error estándar (EEM)

FIG. 6

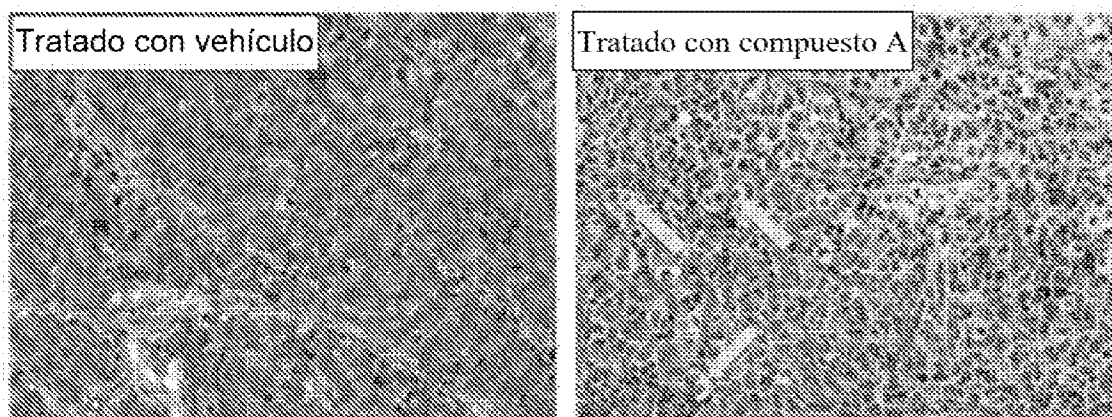


FIG. 7

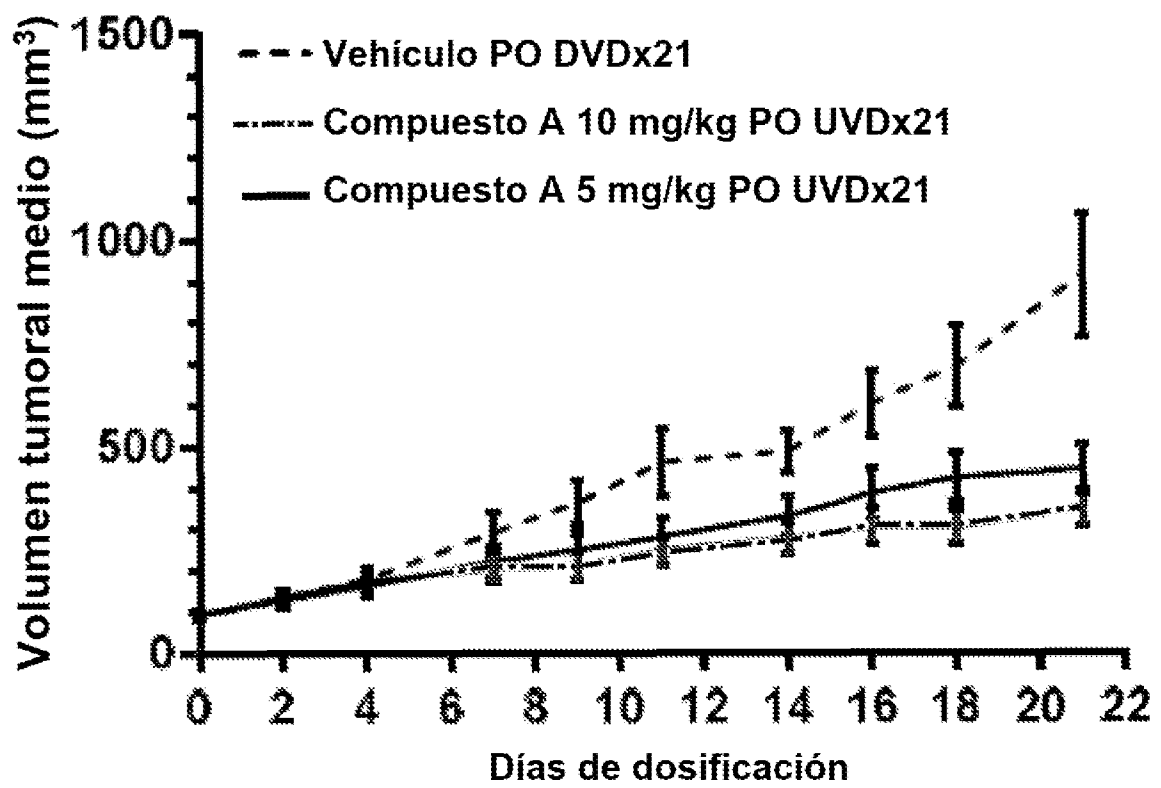


FIG. 8

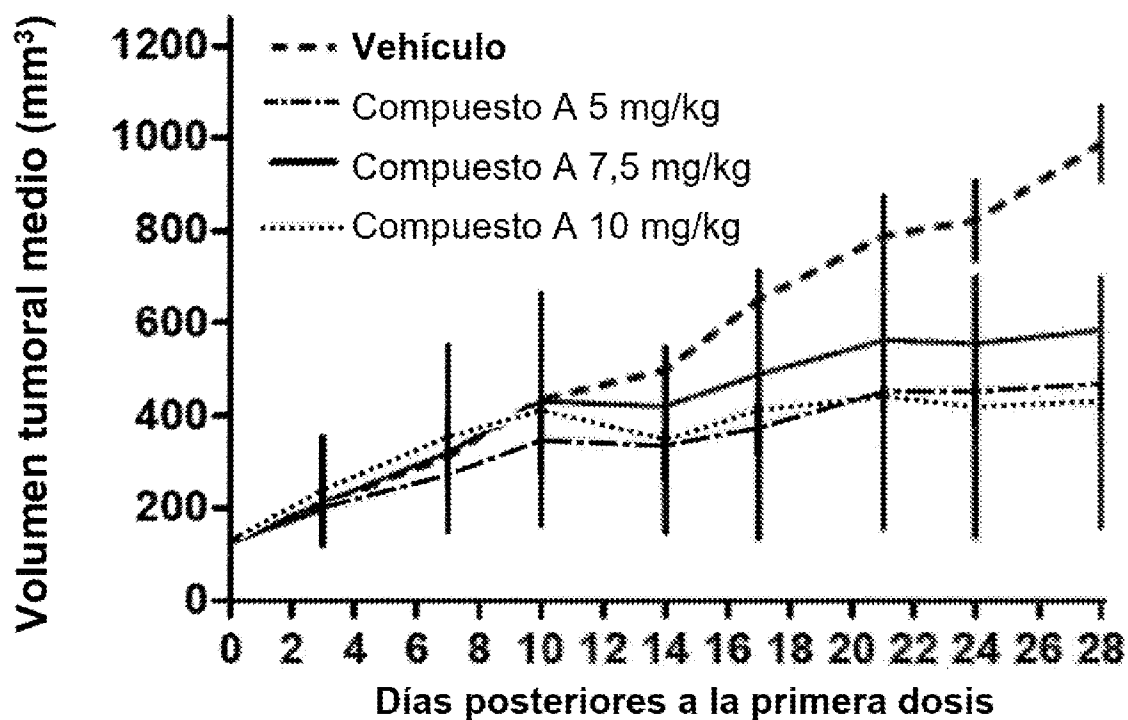


FIG. 9

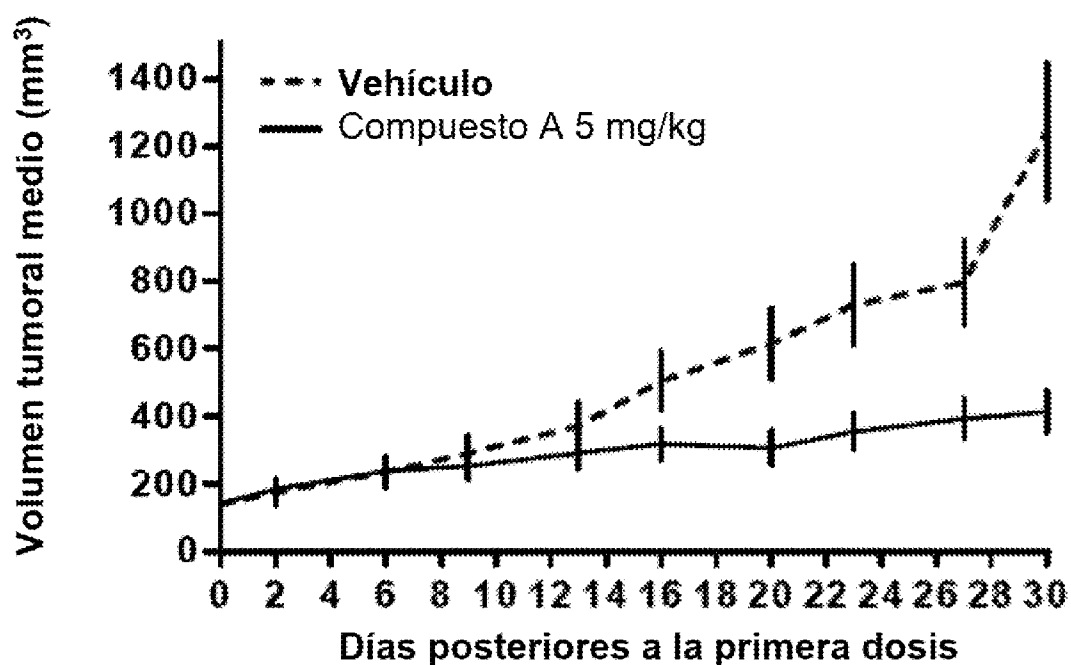


FIG. 10

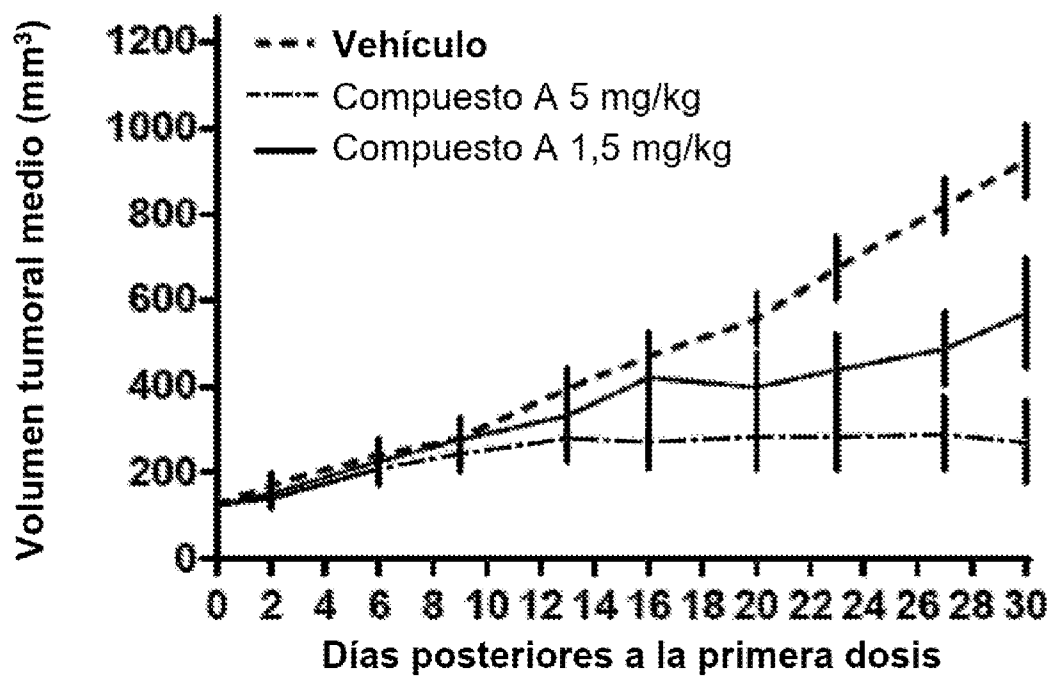


FIG. 11

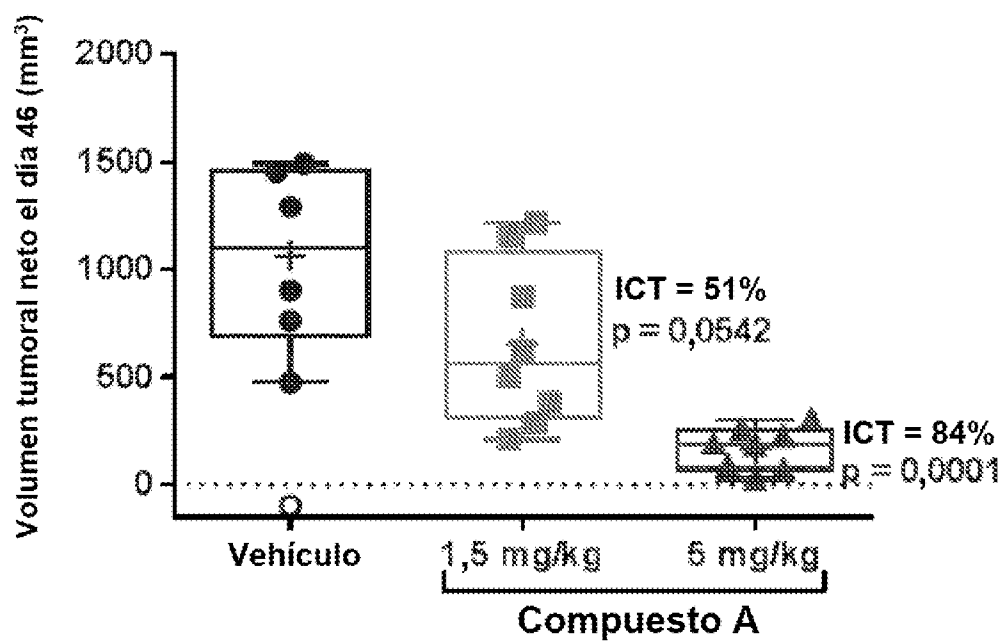


FIG. 12

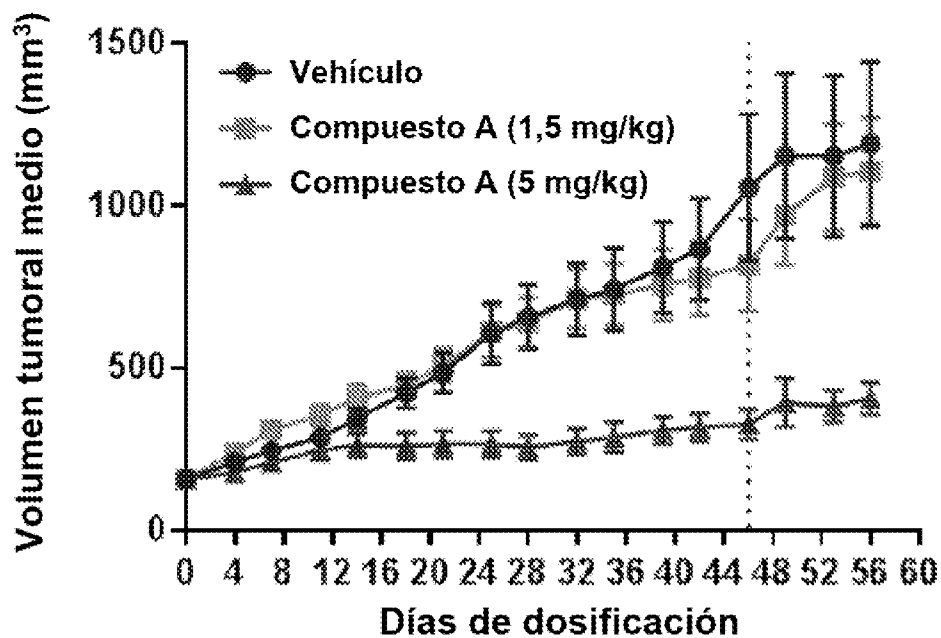


FIG. 13

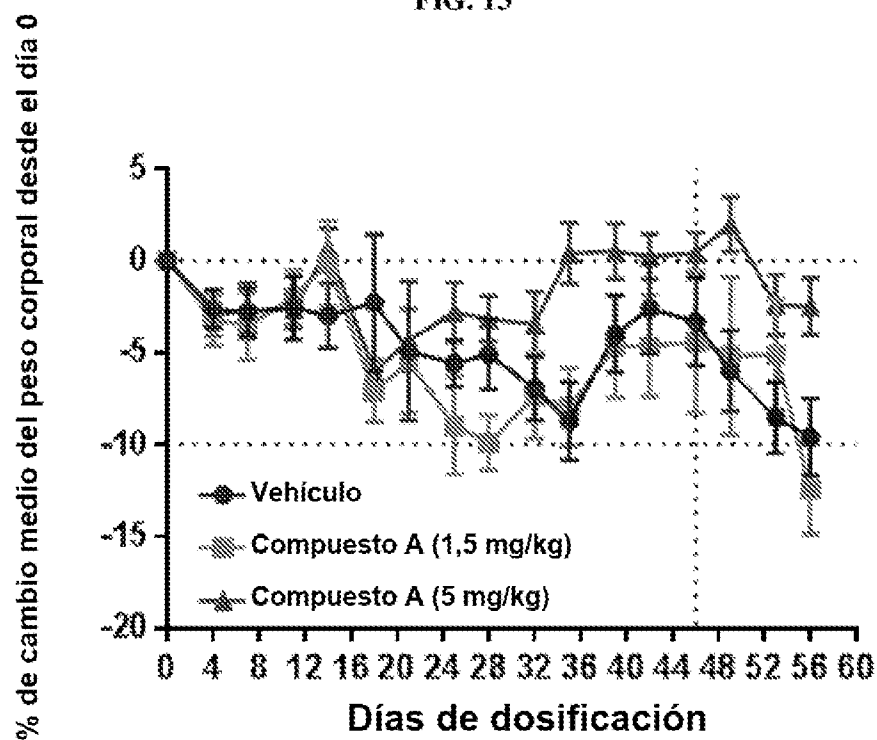


FIG. 14

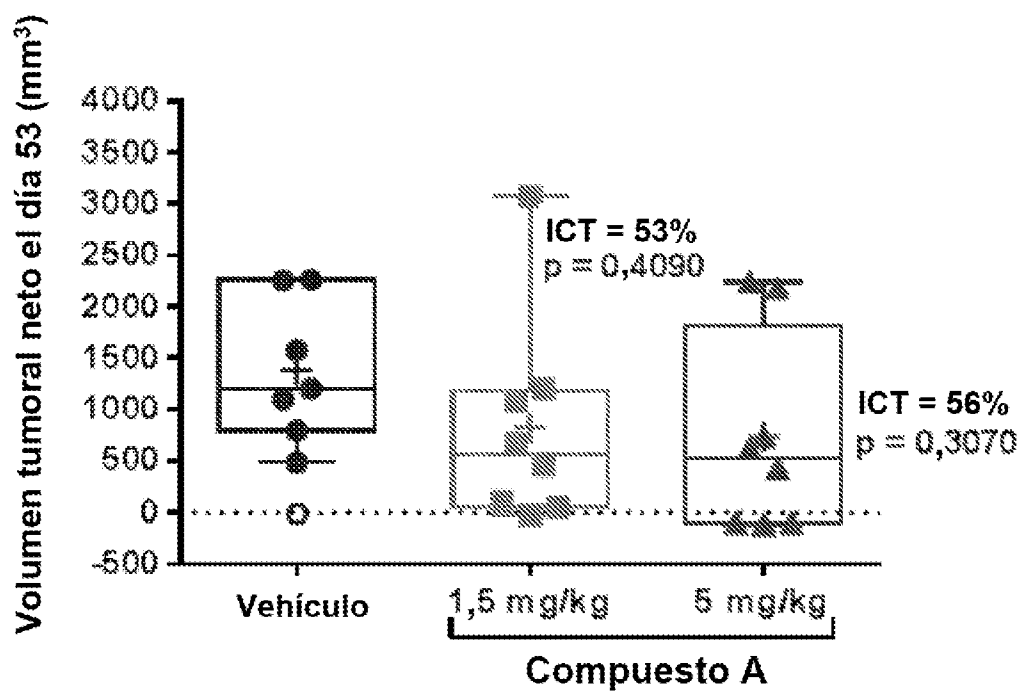


FIG. 15

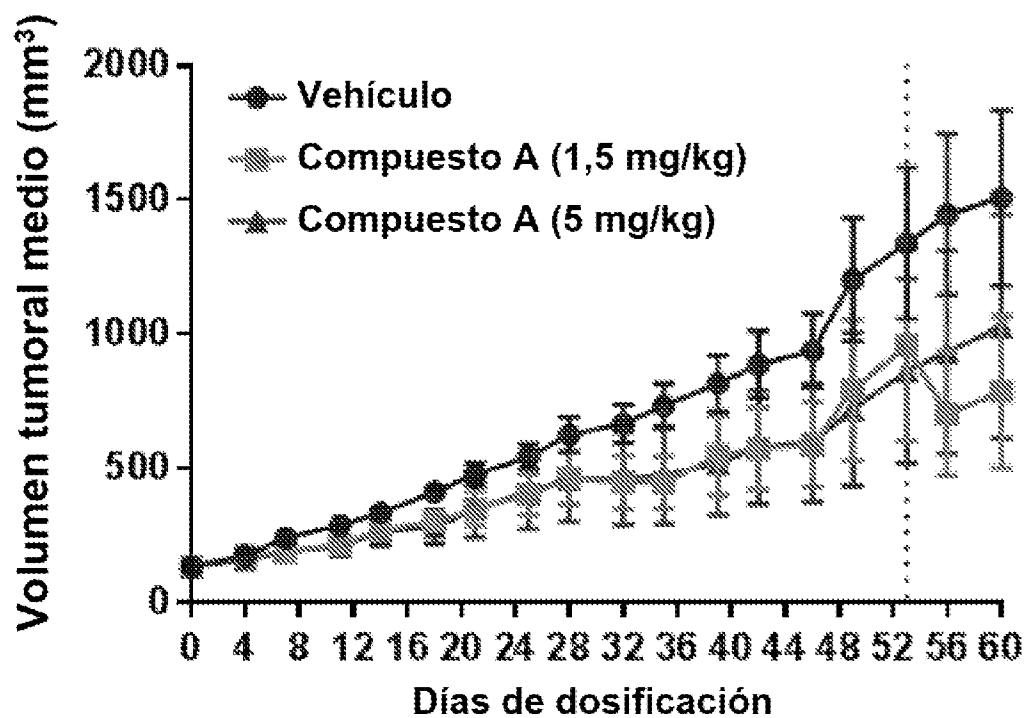


FIG. 16

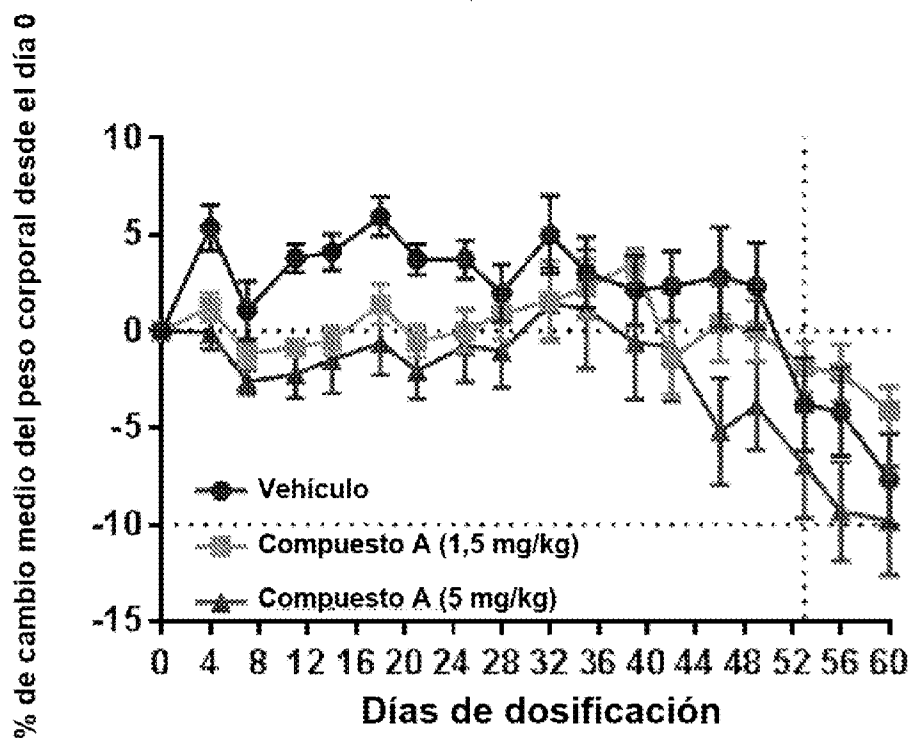


FIG. 17

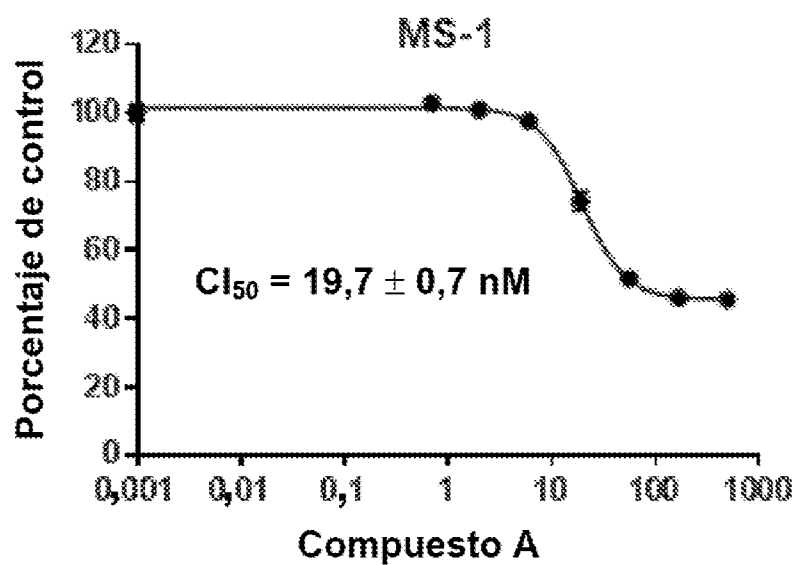
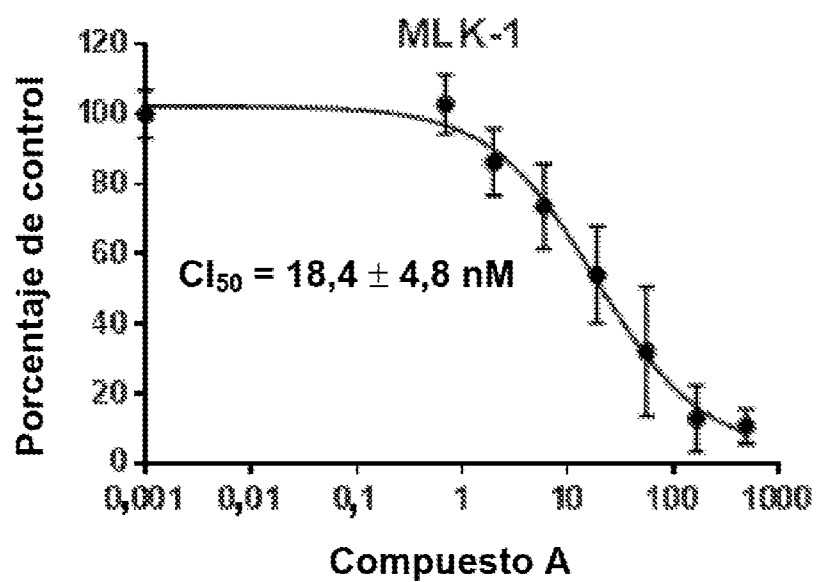


FIG. 18

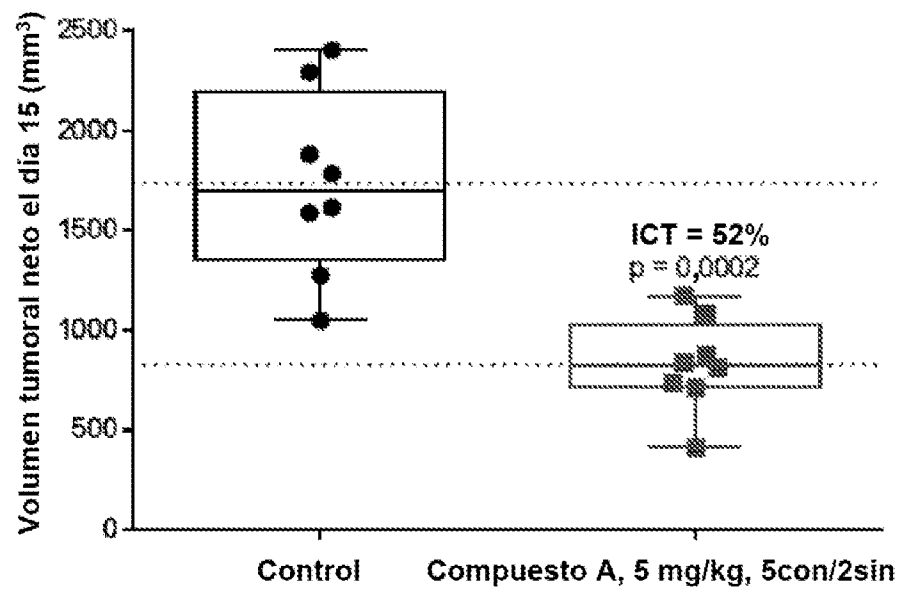


FIG. 19

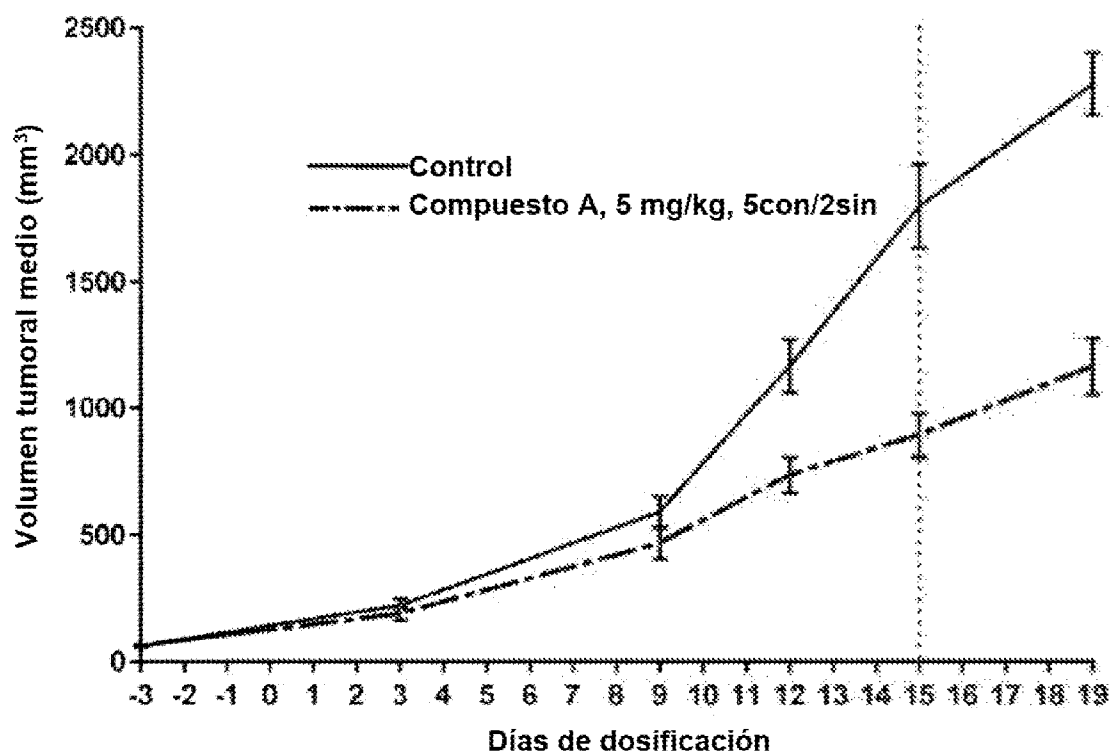


FIG. 20

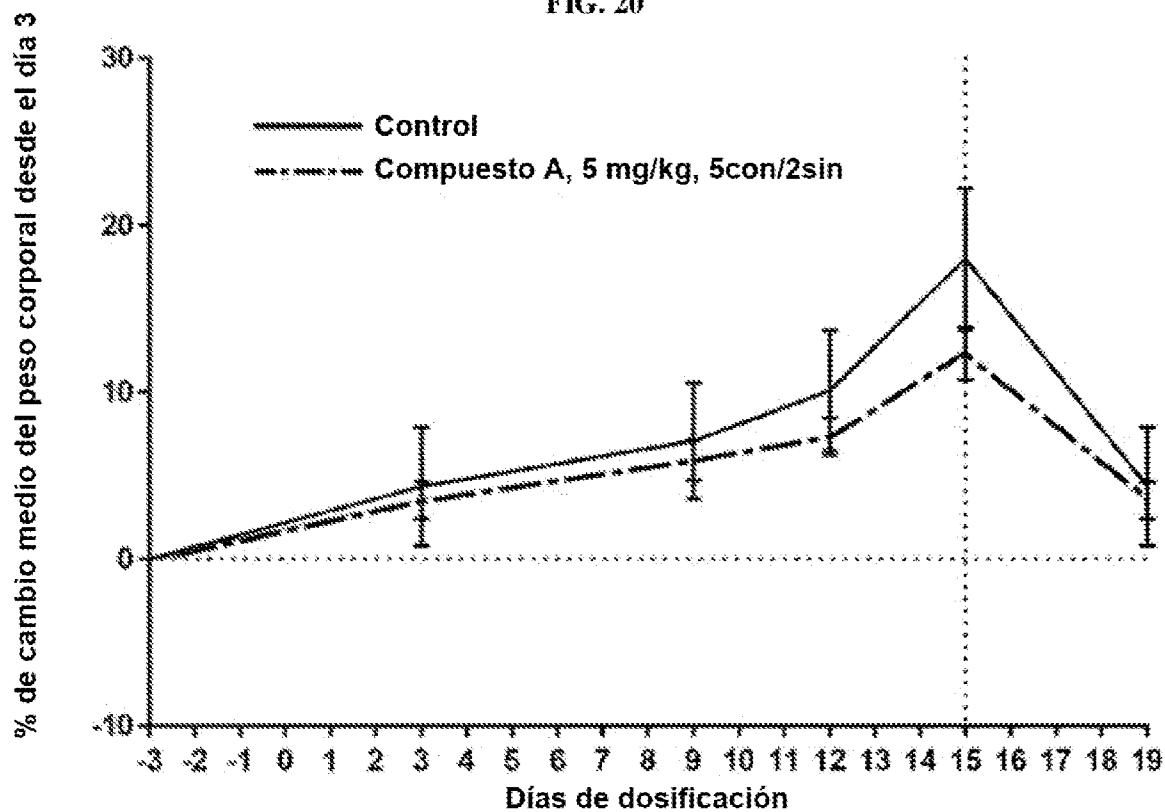


FIG. 21

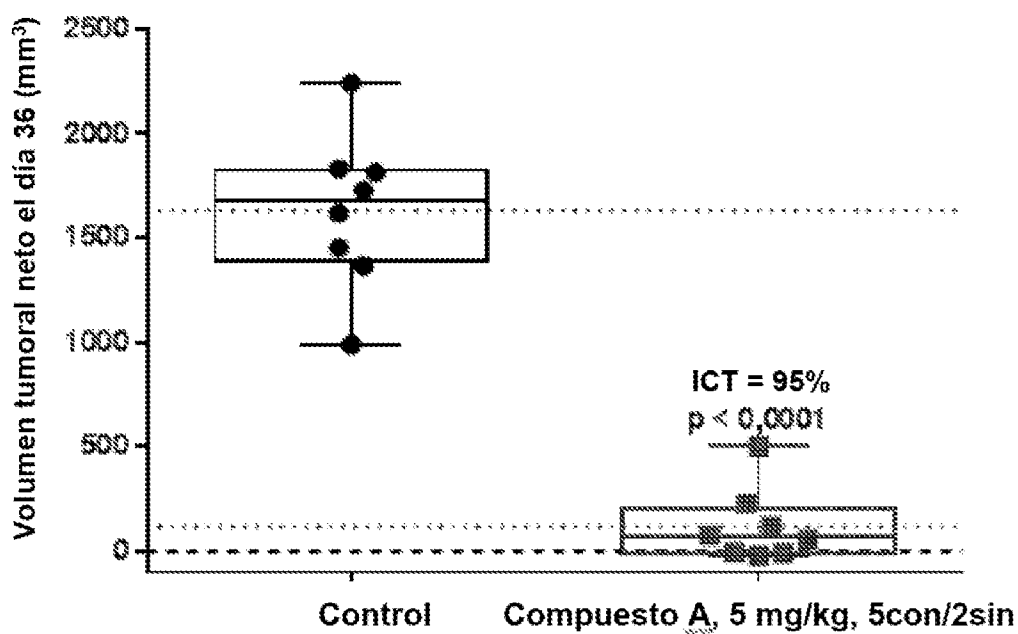


FIG. 22

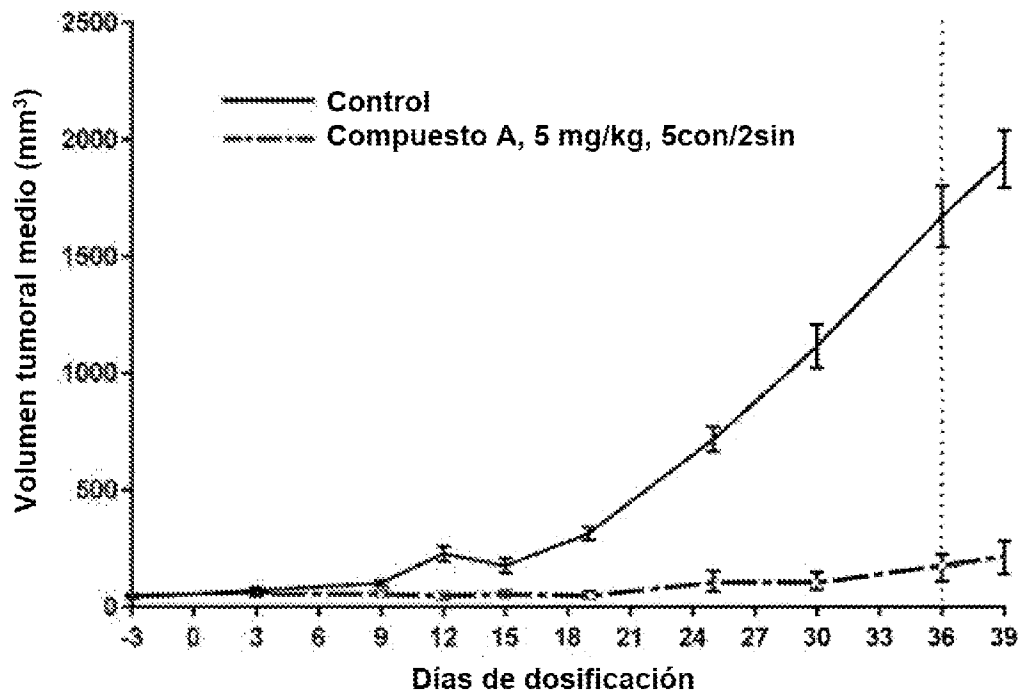


FIG. 23

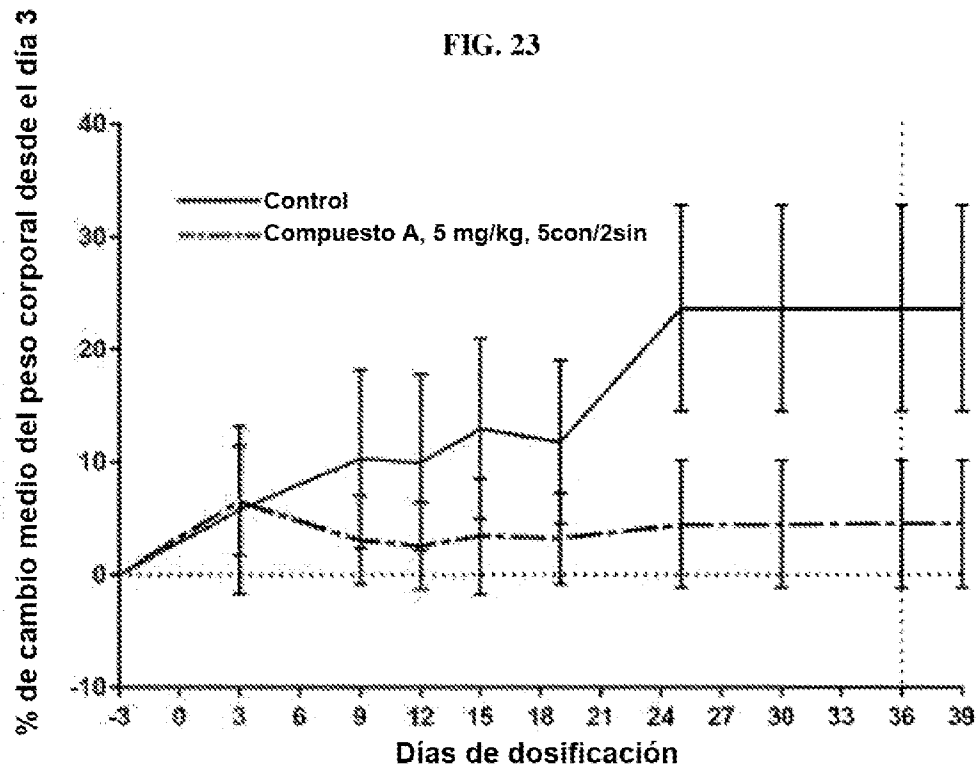


FIG. 24

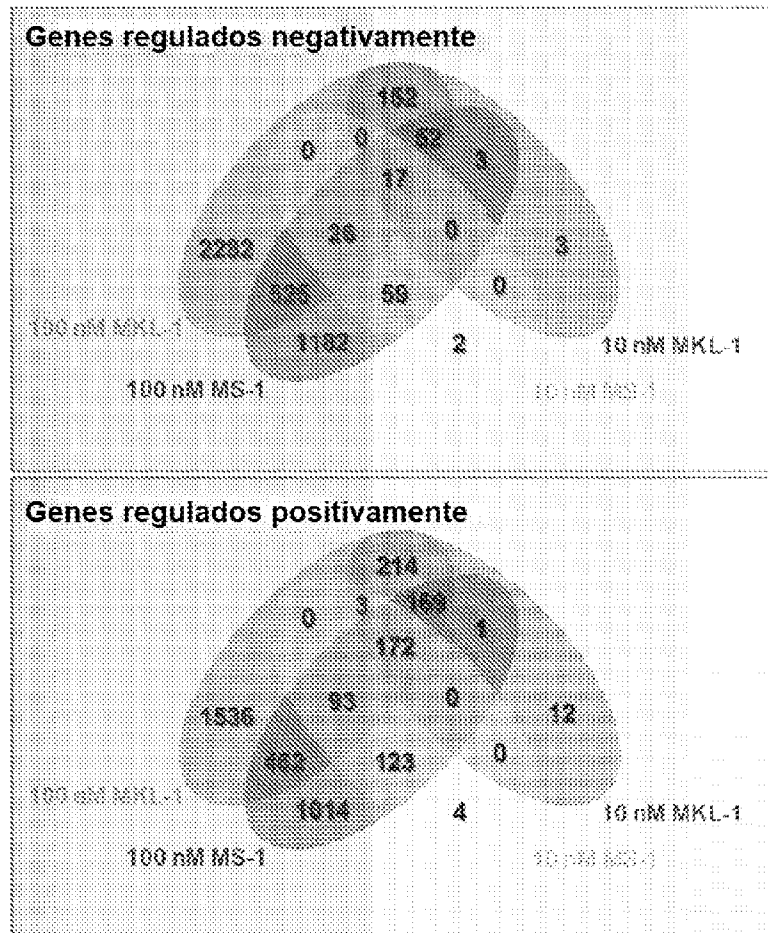




FIG. 26

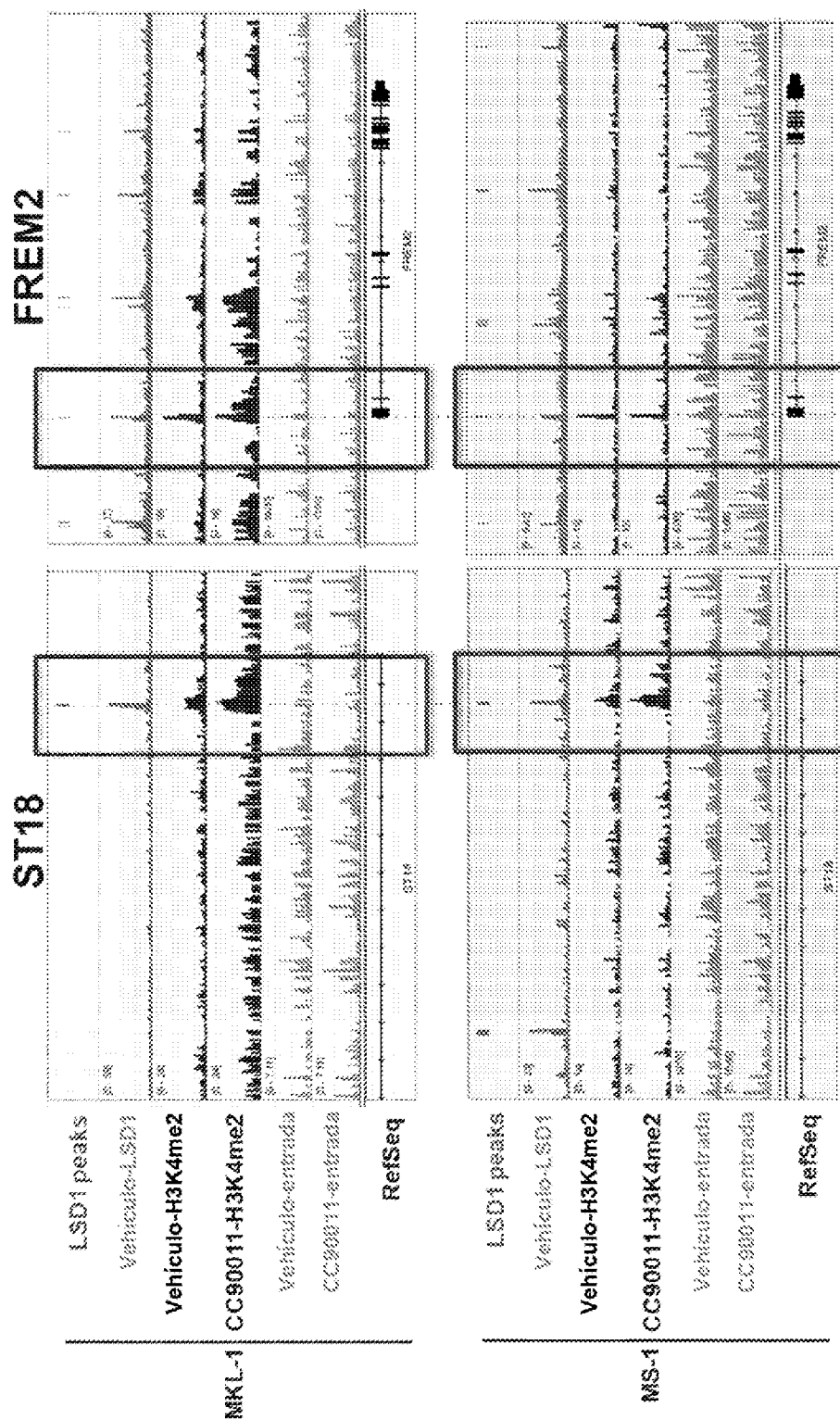


FIG. 27

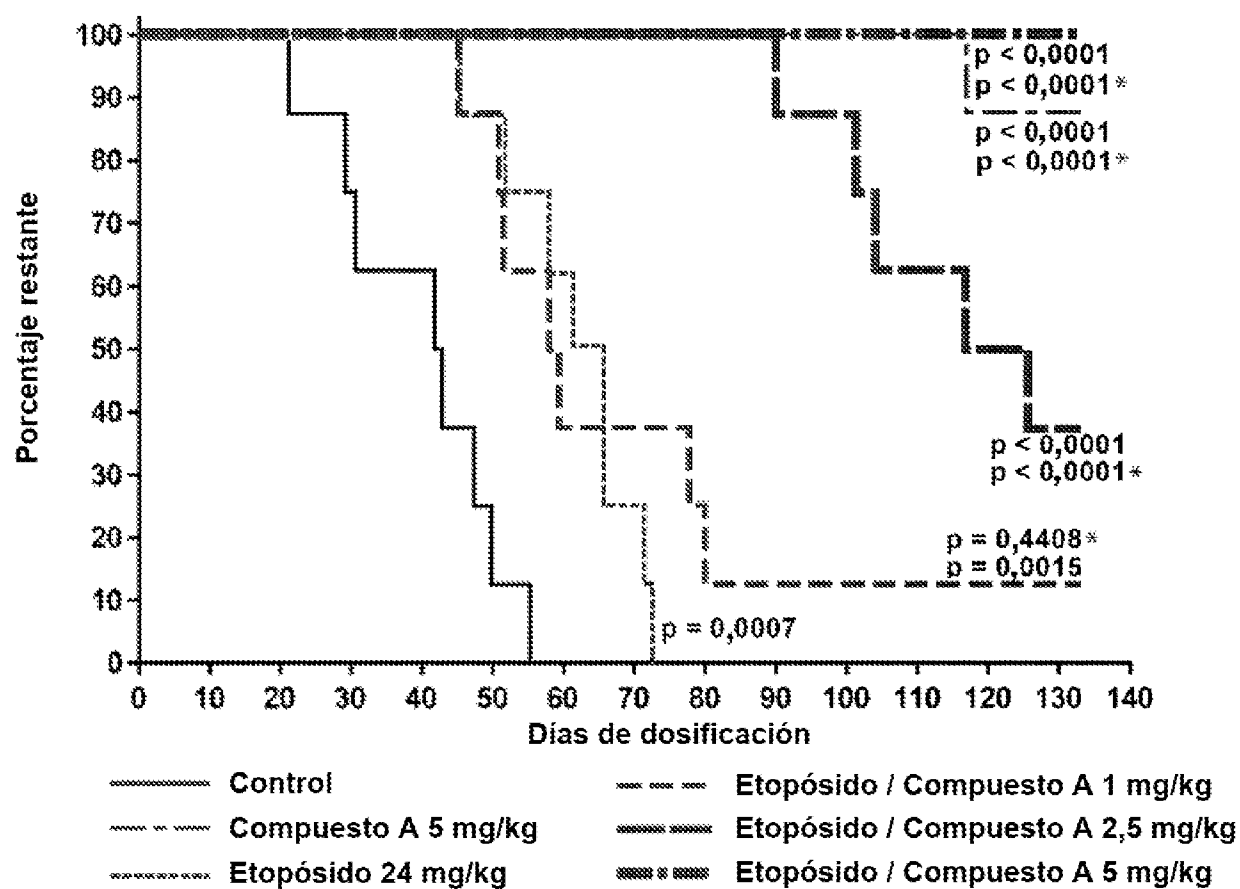


FIG. 28

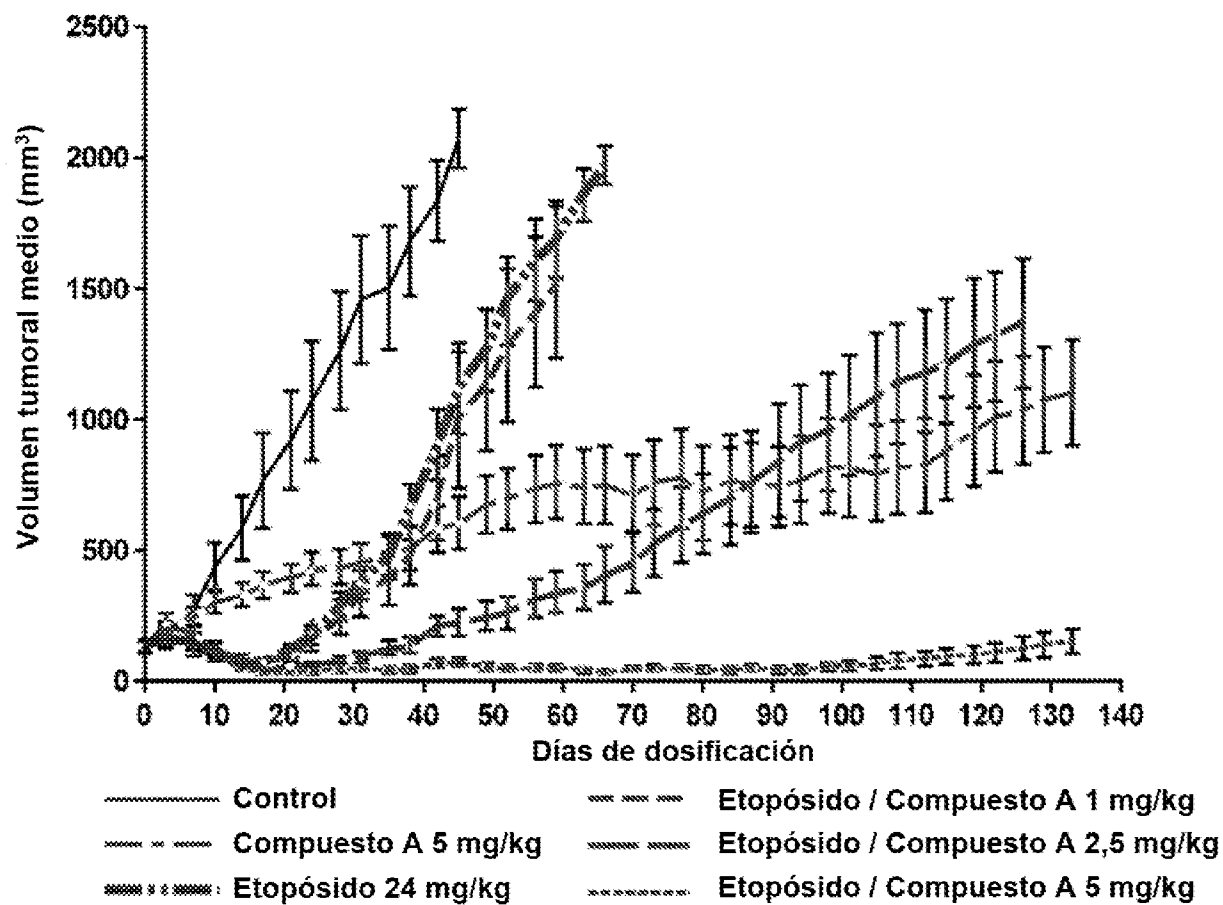


FIG. 29

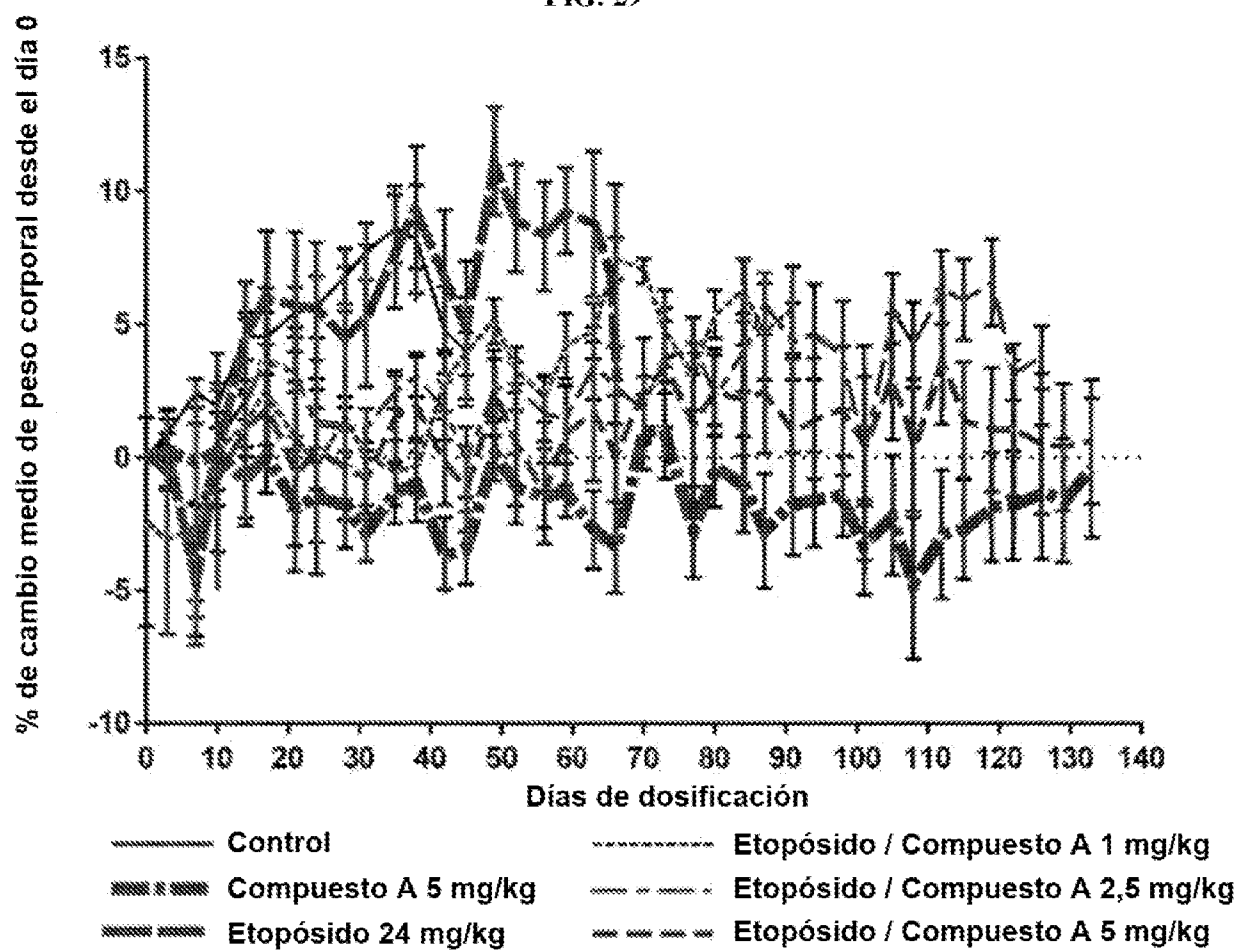


FIG. 30

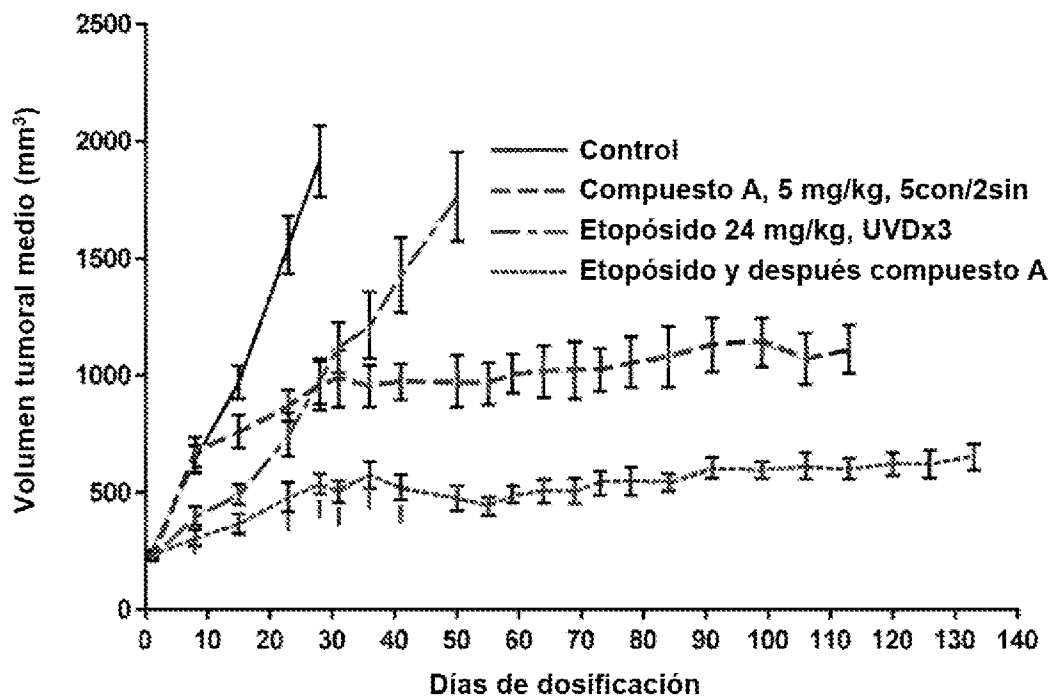


FIG. 31

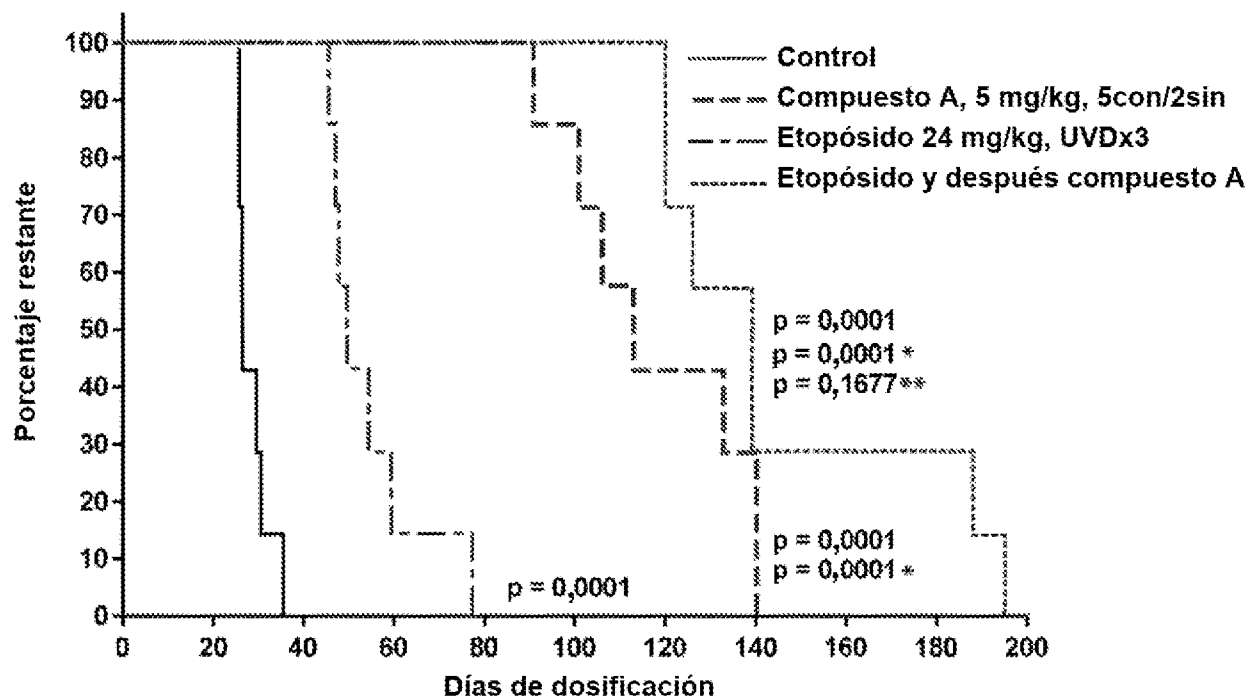


FIG. 32

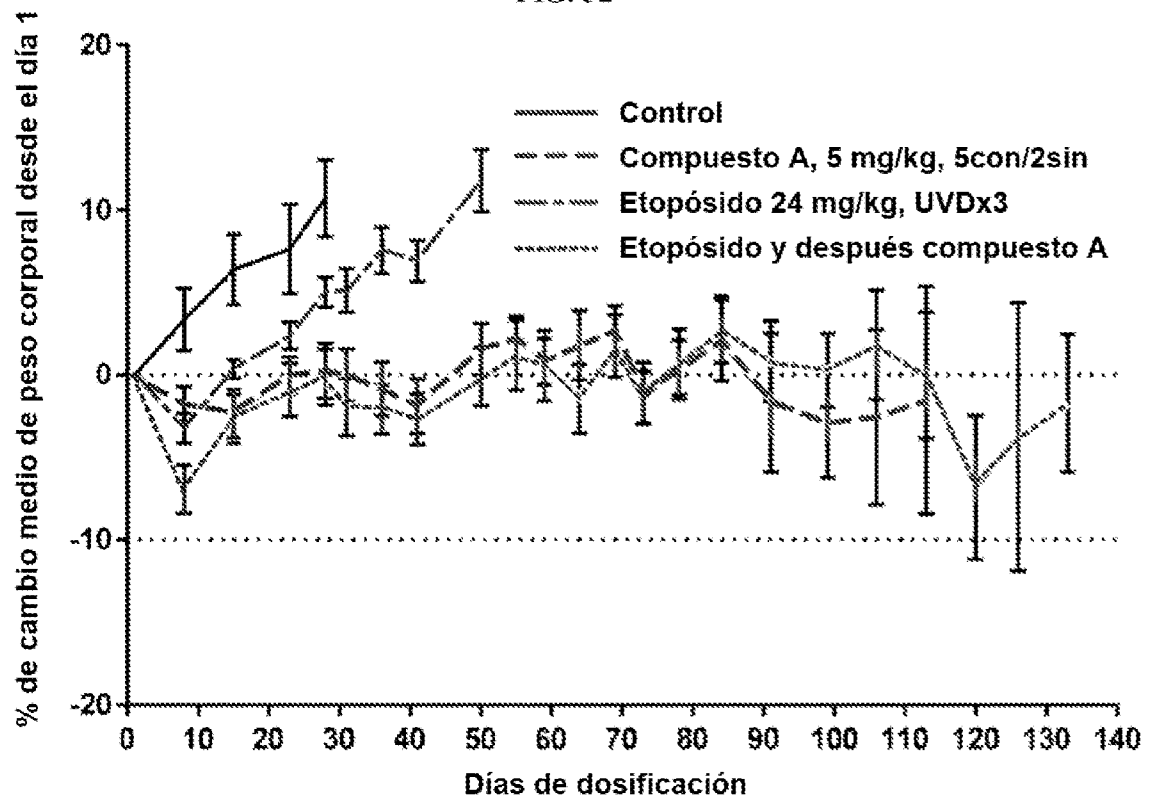


FIG. 33

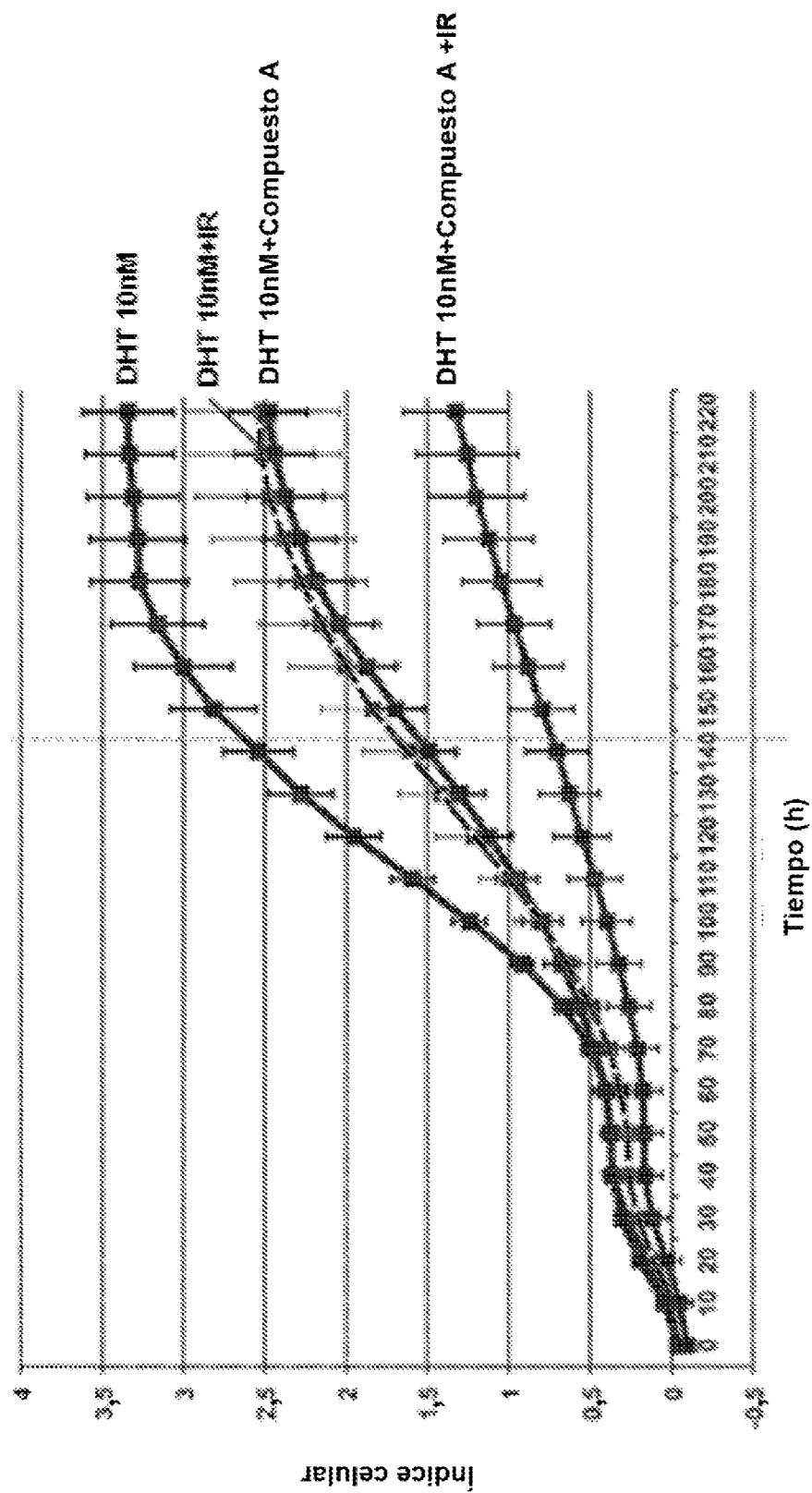


FIG. 34

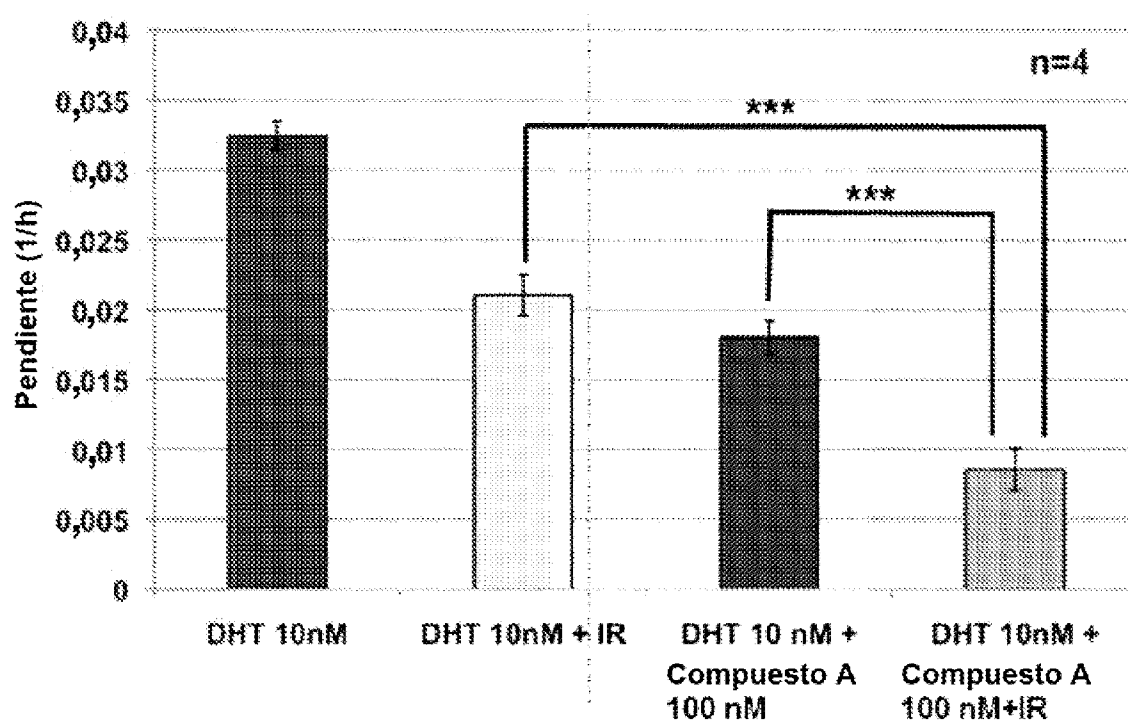


FIG. 35

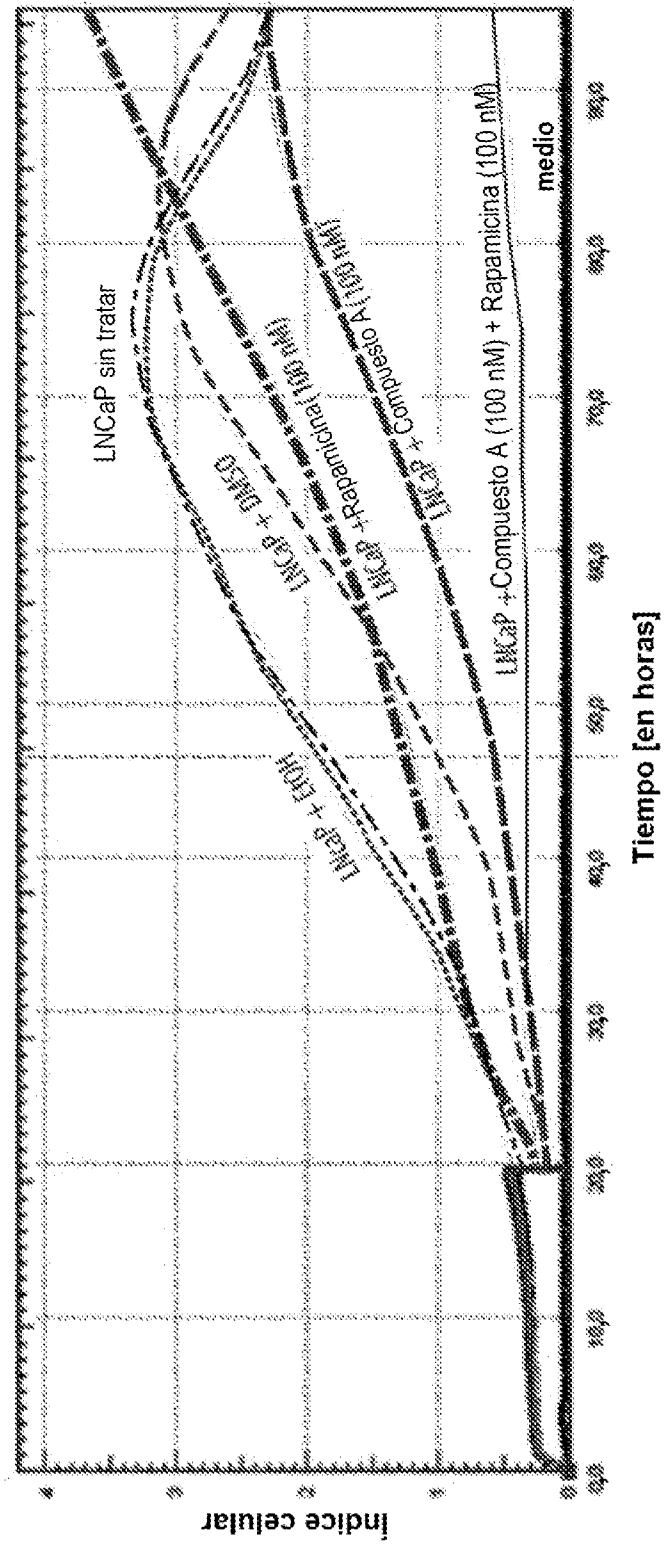


FIG. 36

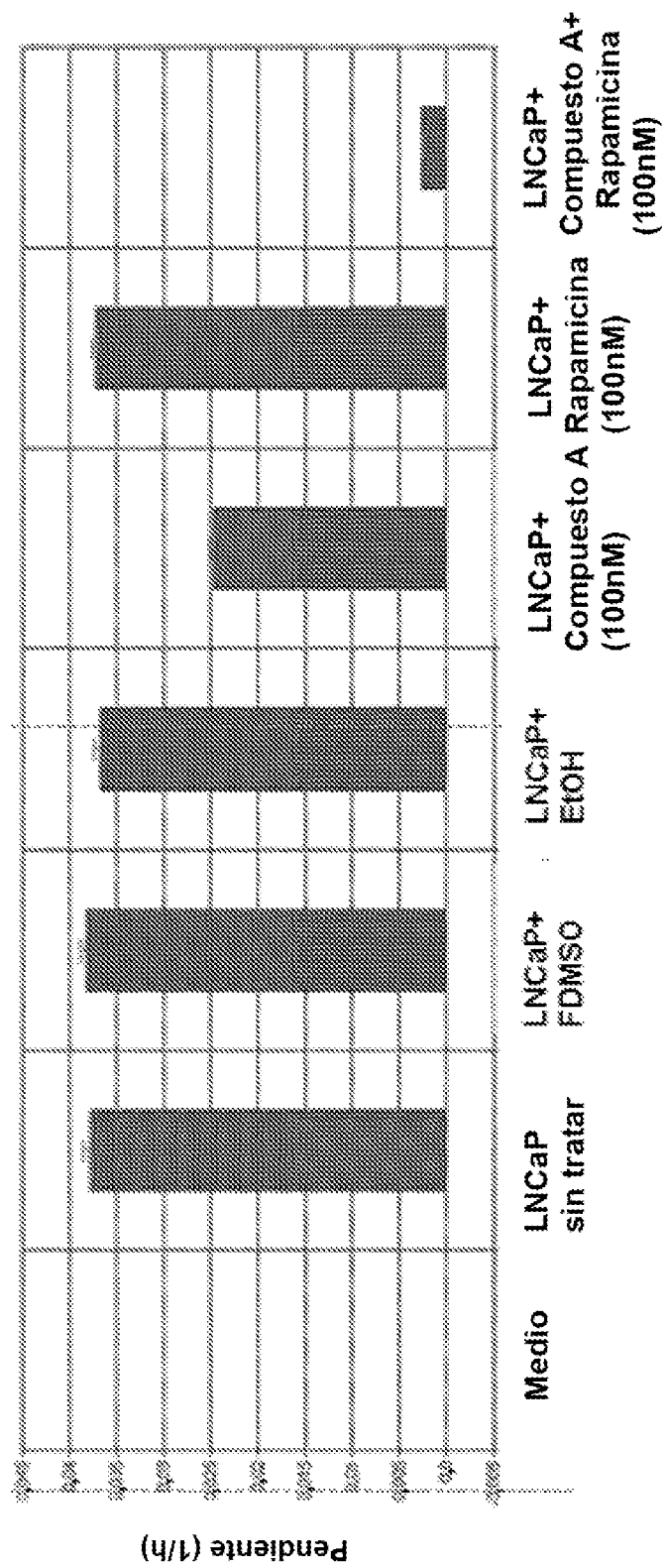


FIG. 37

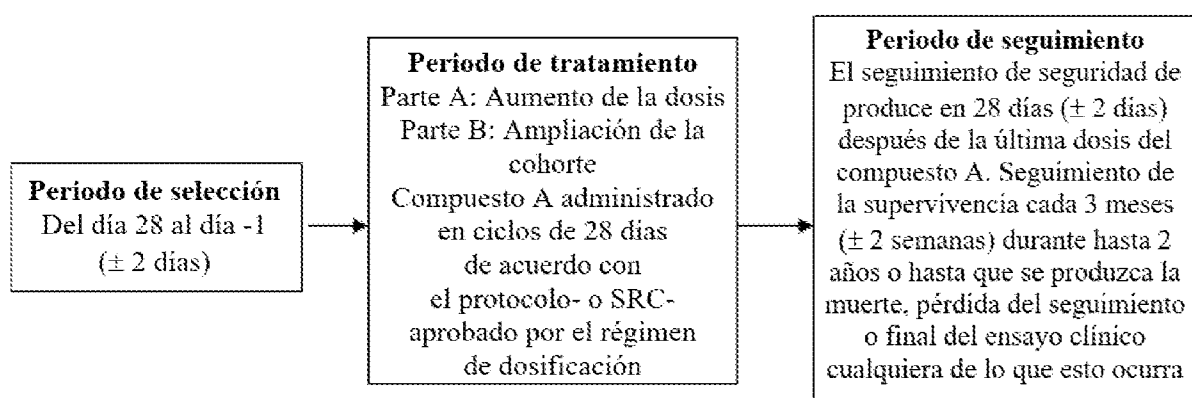


FIG. 38

