

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 941 630**

(51) Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2015 E 20169707 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023 EP 3699181**

(54) Título: **Forma cristalina de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida**

(30) Prioridad:

16.11.2014 US 201462080374 P
01.06.2015 US 201562169545 P

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

24.05.2023

(73) Titular/es:

ARRAY BIOPHARMA, INC. (100.0%)
3200 Walnut Street
Boulder, CO 80301, US

(72) Inventor/es:

ARRIGO, ALISHA B.,
JUENGST, DERRICK y
SHAH, KHALID

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 941 630 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

Forma cristalina de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad para la Solicitud provisional U.S. serie Nos. 62/080,374, presentada el 16 de noviembre de 2014, y 62/169,545, presentada el 1 de junio de 2015.

Antecedentes

1. Campo de la invención

10 La presente divulgación se refiere a (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (Fórmula I) y a sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, la sal de sulfato de hidrógeno, y además a una novedosa forma cristalina de la sal de sulfato de hidrógeno, que presenta inhibición de la proteína tirosina quinasa de la familia Trk, composiciones farmacéuticas que las contienen, procesos para fabricar la forma cristalina, y el uso de la forma compuesta y cristalina en el tratamiento del dolor, la inflamación, el cáncer y ciertas enfermedades infecciosas. Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a un compuesto para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia".

15 2. Descripción de la técnica relacionada

20 Los Trk son tirosina quinasas receptoras de alta afinidad activadas por un grupo de factores de crecimiento solubles llamados neurotrofinas (NT). La familia de receptores Trk tiene tres miembros: TrkA, TrkB y TrkC. Entre las neurotrofinas se encuentran (i) factor de crecimiento nervioso (NGF) que activa TrkA, (ii) factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y NT-4/5 que activan TrkB y (iii) NT3 que activa TrkC. Los Trk se expresan ampliamente en el tejido neuronal y están implicados en el mantenimiento, la señalización y la supervivencia de las células neuronales (Patapoutian, A. et al., Current Opinion in Neurobiology, 2001, 11, 272-280).

25 La literatura reciente ha demostrado que la sobreexpresión, activación, amplificación y/o mutación de Trk están asociadas con muchos cánceres, incluido el neuroblastoma (Brodeur, G. M., Nat. Rev. Cancer 2003, 3, 203-216), cáncer de ovarios (Davidson., B. et al., Clin. Cancer Res. 2003, 9, 2248-2259), cáncer de mama (Kruettgen et al., Patología cerebral 2006, 16: 304-310), Cancer de prostata (Dionne et al., Clin. Cancer Res. 1998, 4(8): 1887-1898), cáncer de páncreas (Dang et al., Journal of Gastroenterology and Hepatology 2006, 21(5): 850-858), mieloma múltiple (Hu et al., Cancer Genetics and Cytogenetics 2007, 178: 1-10), astrocitoma y meduloblastoma (Kruettgen et al., Brain Pathology 2006, 16: 304-310), glioma (Hansen et al., Journal of Neurochemistry 2007, 103: 259-275), melanoma²⁵, carcinoma de tiroides (Brzezianska et al., Neuroendocrinology Letters 2007, 28(3), 221-229), adenocarcinoma de pulmón (Perez-Pinera et al., Molecular and Cellular Biochemistry 2007, 295(1&2), 19-26), tumores neuroendocrinos de células grandes¹⁹ (Marchetti et al., Human Mutation 2008, 29(5), 609-616), y cáncer colorrectal (Bardelli, A., Science 2003, 300, 949). En modelos preclínicos de cáncer, los inhibidores de Trk son eficaces tanto para inhibir el crecimiento tumoral como para detener la metástasis tumoral. En particular, los inhibidores de molécula pequeña no selectivos de las quimeras TrkA, TrkB, TrkC y TrkFc fueron eficaces tanto para inhibir el crecimiento tumoral como para detener la metástasis tumoral²⁵ (Nakagawara, A. (2001) Cancer Letters 169:107-114; Meyer, J. et al. (2007) Leukemia, 1-10; Pierotti, M.A. and Greco A., (2006) Cancer Letters 232:90-98; Eric Adriaenssens, E. et al. CancerRes (2008) 68:(2) 346-351). Por lo tanto, se espera que un inhibidor de la familia de quinasas Trk tenga utilidad en el tratamiento del cáncer.

40 Además, se ha demostrado que los inhibidores de la ruta Trk/neurotrofina son eficaces en numerosos modelos animales preclínicos de dolor. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos antagonistas de NGF y TrkA (por ejemplo, RN-624) son eficaces en modelos animales de dolor inflamatorio y neuropático y en ensayos clínicos en humanos (Woolf, C.J. et al. (1994) Neuroscience 62,327-331; Zahn, P.K. et al. (2004) J. Pain 5, 157-163; McMahon, S. B. et al., (1995) Nat. Med. 1, 774-780; Ma, Q. P. and Woolf, C. J. (1997) Neuroreport 8, 807-810; Shelton, D. L. et al. (2005) Pain 116, 8-16; Delafoy, L. et al. (2003) Pain 105, 489-497; Lamb, K. et al. (2003) Neurogastroenterol. Motil. 15, 355-361; Jaggar, S. I. et al. (1999) Br. J. Anaesth. 83, 442-448). Además, la literatura reciente indica que después de la inflamación, los niveles de BDNF y la señalización de TrkB aumentan en el ganglio de la raíz dorsal (Cho, L. et al. Brain Research 1997, 749, 358) y varios estudios han demostrado que los anticuerpos que disminuyen la señalización a través de la ruta BDNF/TrkB inhiben la hipersensibilización neuronal y el dolor asociado (Chang-Qi, L et al. Molecular Pain 2008, 4:27).

45 Se ha demostrado que el NGF secretado por las células tumorales y los macrófagos que invaden el tumor estimula directamente la TrkA ubicada en las fibras periféricas del dolor. Utilizando varios modelos de tumores tanto en ratones como en ratas, se demostró que la neutralización del NGF con un anticuerpo monoclonal inhibe el dolor relacionado con el cáncer en un grado similar o superior a la dosis más alta tolerada de morfina. Además, la activación de la ruta BDNF/TrkB se ha implicado en numerosos estudios como modulador de varios tipos de dolor, incluido el dolor inflamatorio (Matayoshi, S., J. Physiol. 2005, 569:685-95), dolor neuropático (Thompson, S.W., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 1999, 96:7714-18) y dolor quirúrgico (Li, C.-Q. et al., Molecular Pain, 2008, 4(28), 1-11). Debido a que las quinasas TrkA y TrkB pueden servir como mediadores de respuestas biológicas impulsadas por NGF, los inhibidores de TrkA y/u otras quinasas Trk pueden proporcionar un tratamiento eficaz para estados de dolor crónico.

- 5 Los regímenes de tratamiento actuales para estados de dolor utilizan varias clases de compuestos. Los opiáceos (tal como la morfina) tienen varios inconvenientes, incluidos los efectos respiratorios eméticos, estreñidores y negativos, así como el potencial de adicción. Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, tal como los tipos COX-1 o COX-2) también tienen inconvenientes que incluyen una eficacia insuficiente en el tratamiento del dolor intenso. Además, los inhibidores de la COX-1 pueden causar úlceras en la mucosa. Por consiguiente, existe una necesidad continua de tratamientos nuevos y más eficaces para el alivio del dolor, especialmente del dolor crónico.
- 10 10 Además, se ha demostrado que la inhibición de la ruta neurotrofina/Trk es eficaz en el tratamiento de modelos preclínicos de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, la inhibición de la ruta neurotrofina/Trk se ha implicado en modelos preclínicos de enfermedades pulmonares inflamatorias, incluido el asma (Freund-Michel, V; Frossard, N.; Pharmacology & Therapeutics (2008), 117(1), 52-76), cistitis intersticial (Hu Vivian Y; et. al. The Journal of Urology (2005), 173(3), 1016-21), enfermedades inflamatorias del intestino, incluidas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Di Mola, F. F. et. al., Gut (2000), 46(5), 670-678) y enfermedades inflamatorias de la piel como la dermatitis atópica (Dou, Y.-C.; et. al. Archives of Dermatological Research (2006), 298(1), 31-37), eccema y psoriasis (Raychaudhuri, S. P.; et. al. Journal of Investigative Dermatology (2004), 122(3), 812-819).
- 15 15 La ruta neurotrofina/Trk, en particular BDNF/TrkB, también se ha implicado en la etiología de enfermedades neurodegenerativas, incluidas la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Sohrabji, Farida; Lewis, Danielle K. Frontiers in Neuroendocrinology (2006), 27(4), 404-414). La modulación de la ruta de neutrófilos/Trk puede tener utilidad en el tratamiento de estas enfermedades y otras relacionadas.
- 20 20 También se cree que el receptor TrkA es crítico para el proceso de la enfermedad en la infección parasitaria de Trypanosoma cruzi (enfermedad de Chagas) en huéspedes humanos (de Melo-Jorge, M. et al. Cell Host & Microbe (2007), 1(4), 251-261). Por lo tanto, la inhibición de TrkA puede tener utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y las infecciones protozoarias relacionadas.
- 25 25 Los inhibidores de Trk también pueden encontrar uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con un desequilibrio de la regulación de la remodelación ósea, como la osteoporosis, la artritis reumatoide y las metástasis óseas. Las metástasis óseas son una complicación frecuente del cáncer y ocurren en hasta el 70 % de los pacientes con cáncer de mama o de próstata avanzado(1) y en aproximadamente entre el 15 y el 30 % de los pacientes con carcinoma de pulmón, colon, estómago, vejiga, útero y recto, tiroides o riñón. Las metástasis osteolíticas pueden causar dolor intenso, fracturas patológicas, hipercalcemia potencialmente mortal, compresión de la médula espinal y otros síndromes de compresión nerviosa. Por estas razones, la metástasis ósea es una complicación grave y costosa del cáncer. Por lo tanto, los agentes que pueden inducir la apoptosis de los osteoblastos en proliferación serían muy ventajosos. Se ha observado la expresión de los receptores TrkA y TrkC en el área de formación ósea en modelos de ratón con fractura ósea (K. Asaumi, et al., Bone (2000) 26(6) 625-633). Además, se observó la localización de NGF en casi todas las células formadoras de hueso (K. Asaumi, et al.). Recientemente, se demostró que un inhibidor pan-Trk inhibe la señalización de tirosina activada por la unión de neurotrofinas a los tres receptores Trk en osteoblastos hFOB humanos (J. Pinski, et al., (2002) 62, 986-989). Estos datos respaldan la justificación del uso de inhibidores de Trk para el tratamiento de enfermedades de remodelación ósea, como metástasis óseas en pacientes con cáncer.
- 30 30 40 Se conocen varias clases de inhibidores de molécula pequeña de las quinasas Trk que se dice que son útiles para tratar el dolor o el cáncer (Expert Opin. Ther. Patents (2009) 19(3)).
- 35 35 Las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 2006/115452 y WO 2006/087538 describen varias clases de moléculas pequeñas que se dice que son inhibidores de las quinasas Trk que podrían ser útiles para tratar el dolor o el cáncer.
- 40 40 45 Se conocen compuestos de pirazolo[1,5-a]pirimidina. Por ejemplo, la Publicación de solicitud de patente internacional WO 2008/037477 divulga compuestos de pirazolo[1,5-a]pirimidina que llevan un grupo alquilo, arilo o heterocíclico en la posición 3. Se afirma que estos compuestos son inhibidores de PI3K y/o de la Lípido Quinasa.
- 45 45 La Publicación de Patente PCT No. WO 2008/058126 divulga compuestos de pirazolo[1,5-a]pirimidina que llevan un grupo fenilo en la posición 3. Se afirma que estos compuestos son inhibidores de Pim-quinasa.
- 50 50 55 La Publicación de patente U:S: No. 2006/0094699 divulga compuestos de pirazolo[1,5-a]pirimidina que llevan un -C(=O)NH-fenilo, -C(=O)(4-metilpiperidinilo) o -C(=O)NMe(CH₂-trimetilpirazolilo) en la posición 3 para uso en terapia combinada con un agonista del receptor de glucocorticoides.
- 55 55 Las publicaciones de Patente PCT Nos. WO 2010/033941, WO 2010/048314, WO 2011/006074, y WO 2011/146336 divulgán compuestos que muestran inhibición de la proteína tirosina quinasa de la familia Trk, y que son útiles en el tratamiento del dolor, cáncer, inflamación, enfermedades neurodegenerativas y ciertas enfermedades infecciosas.

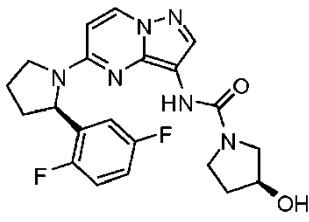
El documento WO 2010/048314 divulga en el Ejemplo 14A una sal de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida. El documento WO 2010/048314 no divulga la forma particular de la sal de sulfato de hidrógeno descrita en este documento cuando se prepara de acuerdo con el método del Ejemplo 14A en ese documento. En particular, el documento WO 2010/048314 no divulga la forma cristalina (I-HS) como se describe a continuación.

Resumen

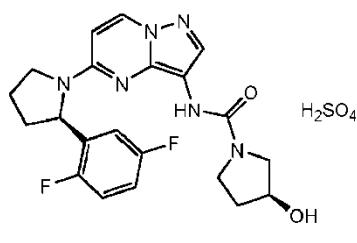
La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

La presente divulgación se refiere a (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (Fórmula I) y a sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, la sal de sulfato de hidrógeno, y además a una novedosa forma cristalina de la sal de sulfato de hidrógeno, que presenta inhibición de la proteína tirosina quinasa de la familia Trk, composiciones farmacéuticas que las contienen, procesos para fabricar la forma cristalina, y el uso de la forma compuesta y cristalina en el tratamiento del dolor, la inflamación, el cáncer y ciertas enfermedades infecciosas.

En el presente documento se proporciona una novedosa forma cristalina del compuesto de Fórmula I:



también conocido como (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida. En particular, la novedosa forma cristalina comprende la sal de sulfato de hidrógeno del compuesto de Fórmula I en una forma polimórfica estable, en lo sucesivo denominada forma cristalina (I-HS) y LOXO-101, que puede caracterizarse, por ejemplo, por su patrón de difracción de rayos X, teniendo la forma cristalina (I-HS) la fórmula:



En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 18.4 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 . En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 . En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 20.2 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 21.5 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 , y 24.0 ± 0.2 . En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 15.3 ± 0.2 , 16.5 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 19.9 ± 0.2 , 20.2 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 21.5 ± 0.2 , 22.1 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 , 24.0 ± 0.2 , 24.4 ± 0.2 , 25.6 ± 0.2 , 26.5 ± 0.2 , 27.6 ± 0.2 , 28.2 ± 0.2 , 28.7 ± 0.2 , 30.8 ± 0.2 y 38.5 ± 0.2 .

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 29.

En algunas realizaciones, la forma cristalina exhibe un inicio máximo de aproximadamente 193 a aproximadamente 205° Celsius, medido por calorimetría diferencial de barrido. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) presenta un calor de fusión de aproximadamente 2,415 mW, medido por calorimetría diferencial de barrido. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un termograma DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 26. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) no es higroscópica.

Algunas realizaciones incluyen una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una forma cristalina (I-HS). Algunas realizaciones incluyen una composición farmacéutica hecha mezclando la forma cristalina (I-HS) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Algunas realizaciones incluyen un proceso de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar la forma cristalina (I-HS) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación también se refiere a métodos para el tratamiento de cáncer, dolor, inflamación y ciertas enfermedades infecciosas que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS). Algunas realizaciones incluyen el uso de la forma cristalina (I-HS) en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer, el dolor, la inflamación y ciertas enfermedades infecciosas, en un sujeto que lo necesite.

5 También se proporciona en el presente documento un método para tratar un cáncer mediado por una quinasa Trk en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS). En algunas realizaciones, el cáncer está mediado por Trk; TrkB; o TrkA y TrkB. En algunas realizaciones, se diagnostica o se identifica que un paciente tiene un cáncer asociado a Trk.

10 Además, en el presente documento se proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método: (a) determinar si el cáncer está asociado con uno o más de sobreexpresión, activación, amplificación y mutación de una quinasa Trk; y (b) si se determina que el cáncer está asociado con una o más de sobreexpresión, activación, amplificación y mutación de una quinasa Trk, administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS). En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: (a) determinar si el cáncer está mediado por una quinasa Trk; y (b) si se determina que el cáncer está mediado por una quinasa Trk, administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS). También se proporciona en este documento un método para tratar a un sujeto que comprende: (a) realizar un ensayo en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o el nivel de los mismos; y (b) administrar a un sujeto que se ha determinado que tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS).

15 En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o nivel de los mismos es una traducción cromosómica que da como resultado la traducción de una proteína de fusión Trk. Por ejemplo, la proteína de fusión Trk se selecciona del grupo que consiste en: TP53-TrkA, LMNA-TrkA, CD74-TrkA, TFG-TrkA, TPM3-TrkA, NFASC-TrkA, BCAN-TrkA, MPRIP-TrkA, TPR-TrkA, RFWD2-TrkA, IRF2BP2-TrkA, SQSTM1-TrkA, SSBP2-TrkA, RABGAP1L-TrkA, C18ORF8-TrkA, RNF213-TrkA, TBC1D22A-TrkA, C20ORF112-TrkA, DNER-TrkA, ARHGEF2-TrkA, CHTOP-TrkA, PPL-TrkA, PLEKHA6-TrkA, PEAR1-TrkA, MRPL24-TrkA, MDM4-TrkA, LRRC71-TrkA, GRIPAP1-TrkA, EPS15-TrkA, DYNC2H1-TrkA, CEL-TrkA, EPHB2-TrkA, TGF-TrkA, NACC2-TrkB, QKI-TrkB, AFAP1-TrkB, PAN3-TrkB, SQSTM1-TrkB, TRIM24-TrkB, VCL-TrkB, AGBL4-TrkB, DAB2IP-TrkB, ETV6-TrkC, BTBD1-TrkC, LYN-TrkC, RBPM3-TrkC, EML4-TrkC, HOMER2-TrkC, TFG-TrkC, FAT1-TrkC, y TEL-TrkC.

20 En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad de los mismos es una o más mutaciones puntuales en el gen. Por ejemplo, el gen NTRK es un gen NTRK1, y una o más mutaciones puntuales en el gen NTRK1 dan como resultado la traducción de una proteína TrkA que tiene sustituciones en una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos: 33, 336, 337, 324, 420, 444, 517, 538, 649, 682, 683, 702 y 1879. 25 En algunas realizaciones, una o más mutaciones puntuales en el gen NTRK1 dan como resultado la traducción de una proteína TrkA que tiene una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: R33W, A336E, A337T, R324Q, R324W, V420M, R444Q, R444W, G517R, G517V, K538A, R649W, R649L, R682S, V683G, R702C y C1879T.

30 Las características y ventajas descritas en este resumen y la siguiente descripción detallada no son exhaustivas. Muchas características y ventajas adicionales serán evidentes para un experto normal en la técnica a la vista de los dibujos, la especificación y las reivindicaciones de este documento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 ilustra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de forma cristalina (I-HS) preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, de acuerdo con una realización.

40 Figura 2 ilustra un perfil de (I-HS) de analizador térmico diferencial/termogravimétrico simultáneo (TG/DTA) de la forma cristalina preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, de acuerdo con una realización.

45 Figura 3 ilustra un perfil de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de forma cristalina (I-HS) preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, de acuerdo con una realización.

Figuras 4A y 4B ilustran imágenes de microscopía de luz polarizada (PLM) de forma cristalina (I-HS) preparadas de acuerdo con el Ejemplo 2 bajo luz (A) no polarizada y (B) polarizada, de acuerdo con algunas realizaciones.

50 Figura 5 ilustra un perfil de isoterma de sorción dinámica de vapor (DVS) de forma cristalina (I-HS) preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, de acuerdo con una realización.

Figura 6 ilustra un perfil de espectroscopia infrarroja (IR) de forma cristalina (I-HS) preparado de acuerdo con el Ejemplo 2, de acuerdo con una realización.

55 Figura 7 ilustra un patrón de XRPD de la forma de base libre amorfa de un compuesto de Fórmula I, de acuerdo con una realización.

Figura 8 es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células de adenocarcinoma de pulmón CUTO-3F que albergan una proteína de fusión MPRIP-NTRK1 usando la forma cristalina (I-HS).

5 Figura 9 es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células de cáncer colorrectal KM12 que albergan una proteína de fusión TPM3-NTRK1 usando la forma cristalina (I-HS).

Figura 10 es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células de leucemia mieloide aguda MO-91 que albergan una proteína de fusión ETV6-NTRK3 usando la forma cristalina (I-HS).

10 Figura 11 es una inmunotransferencia que muestra que la forma cristalina (I-HS) inhibe la activación de la quinasa MPRIP-TRKA, ERK1/2 en células CUTO-3F y la actividad de AKT en células KM12. Las células se trataron durante 2 horas con la forma cristalina (I-HS) a las dosis indicadas.

Figura 12 es una inmunotransferencia que muestra que la forma cristalina (I-HS) inhibe la activación de la quinasa TPM3-TRKA y la actividad ERK1/2 y AKT corriente abajo en células KM12. Las células se trataron durante 2 horas con la forma cristalina (I-HS) a las dosis indicadas.

15 Figura 13 es una inmunotransferencia que muestra que la forma cristalina (I-HS) inhibe la actividad de quinasa TEL-TRKC y ERK1/2 y AKT en células MO-91. Las células se trataron durante 2 horas con la forma cristalina (I-HS) a las dosis indicadas.

Figura 14 es un esquema que representa la fusión del gen LMNA-NTRK1 identificada en la muestra de tumor del paciente: la unión de los dos primeros exones de LMNA (NM_170707) con el exón 11-17 de NTRK1 (NM_002529).

20 Figura 15 es una micrografía de fluorescencia del ensayo FISH de ruptura de NTRK1, que muestra señales emparejadas verdes (5' NTRK1) y rojas (3' NTRK1) correspondientes al gen normal (flecha amarilla) y señales rojas aisladas (flechas rojas) se observan en núcleos tumorales (teñidos de azul con DAPI) indican una delección cromosómica que conduce a una fusión del gen NTRK1.

Figura 16 es una cromatografía de la secuenciación de ADN del producto de RT-PCR usando cebadores LMNA (5') y NTRK1 (3') que indican el punto de ruptura de fusión entre el exón 2 LMNA y el exón 11 de NTRK1.

25 Figura 17 es un esquema del ensayo de ligadura de proximidad TRK-SHC1 (PLA). Esta representación en boceto demuestra la detección de proteínas TRK y SHC1 proximales (< 40 nM) en células tumorales. El anticuerpo TRK (conejo) utilizado puede detectar el terminal c de las proteínas TRKA (codificado por NTRK1), TRKB (NTRK2) o TRKC (NTRK3). SHC1 es detectado por un anticuerpo SHC1 (ratón). La unión de anticuerpos secundarios específicos de especie con secuencias de nucleótidos complementarias unidas covalentemente permite una reacción de PCR *in situ* para generar ADN, que puede detectarse mediante hibridación fluorescente *in situ* visualizada en el método como puntos rojos. El ensayo tiene el potencial de detectar TRK activado independientemente del mecanismo de activación (fusión de genes, mutación o activación autocrina/paracrina del tipo salvaje) del miembro de la familia de receptores TRK (TRKA/B/C).

30 Figura 18 es un conjunto de datos que validan el TRK-SHC1 PLA. (A) La línea celular CUTO-3, derivada de un derrame pleural maligno de un paciente con adenocarcinoma de pulmón en estadio IV que albergaba la fusión del gen MPRIP-NTRK1, se transfeció con un ARNsi de control no dirigido (NTC), ARNsi dirigido por NTRK1, o sin tratar (control) y ensayado para determinar la expresión de la proteína TRKA. El análisis de transferencia Western demuestra una marcada disminución en los niveles de proteína TRKA y corresponde a la proteína de fusión MPRIP-TRKA que migra con un peso molecular aparente de 170 kD. TRK-SHC1 PLA se realizó en células tratadas como en (A) demostrando una señal positiva robusta en el control de ARNsi (B), pero una disminución proporcional en el ARNsi de NTRK1 (C). Las células CUTO-3 se trataron con DMSO (D) o forma cristalina (I-HS) a una concentración de 100 nM (E) durante 2 horas, lo que demuestra la interrupción de los complejos TRKA-SHC1 en la muestra tratada con forma cristalina (I-HS) en comparación con control. CULC001 es un xenoinjerto de tumor derivado del paciente (PDX) derivado del mismo tumor que la línea celular CUTO-3 y alberga la fusión del gen MPRIP-NTRK1 (no se muestra). CULC002 es un PDX de un paciente con NSCLC sin un controlador conocido (ALK, ROS1, EGFR, KRAS y BRAF negativos) y es negativo para una fusión del gen NTRK1 mediante FISH de ruptura de NTRK1 (no se muestra). El análisis TRK PLA demuestra una señal robusta en CULC001 (F) pero ninguna señal en los núcleos tumorales CULC002 (G). Los paneles (H) e (I) muestran un haz de nervios del CULC001 PDX. TRK-SHC1 PLA es positivo solo en esta región de la muestra tumoral CULC002 y sugiere señalización autocrina en un receptor TRKA, TRKB o TRKC, ya que esta familia se expresa en tejido nervioso y sirve como control positivo interno para esta muestra tumoral negativa.

45 Figura 19 es una imagen de un ensayo de ligadura de proximidad TRK SHC1 y un control. (A) El ensayo de ligadura de proximidad TRK-SHC1 demuestra una señalización sólida en los núcleos tumorales pero una señalización débil en el vaso sanguíneo de paredes gruesas. Los núcleos se teñieron con DAPI (azul) y las señales rojas representan un PLA positivo indicativo de complejos de proteína TRKA-SHC 1. Se indica un vaso sanguíneo dentro de la elipse parcial (línea blanca punteada). (B) Sección de tejido tumoral adyacente teñida con hematoxilina y eosina que indica un vaso sanguíneo de paredes gruesas (dentro de una elipse parcial indicada por una línea blanca punteada) y núcleos tumorales que lo flanquean.

Figura 20 son un conjunto de imágenes que muestran TRK y ALK PLA en una muestra de tumor ALK+. La muestra de tumor FFPE de un paciente con ALK+ (muestra de autopsia) se ensayó utilizando TRK-SHC1 PLA (A) que demostró una ausencia de señal o ALK-GRB2 PLA (B) que mostró una sólida señalización de ALK.

5 Figura 21 es un conjunto de tres imágenes de tomografía computarizada de un sujeto que tiene sarcoma indiferenciado. Las imágenes de CT se obtuvieron después de la quimioterapia preoperatoria y la resección del tumor primario con una flecha que indica la presencia de un nódulo pulmonar derecho de 18 mm (A), imágenes de línea base justo antes de la dosificación con la forma cristalina (I-HS) en el estudio (B), y después de 1 ciclo (28 días) de dosificación con la forma cristalina (I-HS) (C). Se observó que el paciente tenía enfermedad metastásica solo en los pulmones y, por lo tanto, las imágenes de tomografía computarizada muestran imágenes axiales (arriba) y coronales (abajo) enfocadas en la cavidad torácica. Las imágenes demuestran una rápida progresión inicial de la enfermedad (A-B, intervalo de 13 semanas) seguida de una marcada respuesta tumoral con disminución del tamaño y/o resolución de las numerosas metástasis pulmonares (B-C, intervalo de 4 semanas).

10 Figura 22 es un gráfico que muestra los niveles de CA125 en suero en un paciente que tiene sarcoma indiferenciado tratado con forma cristalina (I-HS) a lo largo del tiempo. Se encontró que los niveles séricos de CA125 estaban elevados en este paciente y, posteriormente, se siguieron como un indicador potencial de actividad. Se extrajo CA125 sérico en la línea base (día -8) antes de la dosificación y en los puntos de tiempo indicados después del inicio de la dosificación en el día -3 hasta el día 56, lo que demuestra una disminución dependiente del tiempo en este marcador tumoral. La línea roja discontinua indica el límite superior de lo normal (35 U/mL) de esta prueba de laboratorio.

15 Figura 23 es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células HCC78 que albergan una proteína de fusión SLC34A2-ROS1 usando la forma cristalina (I-HS).

20 Figura 24 es un gráfico que muestra datos termográficos para AM(HS)1. La línea superior del gráfico es un gráfico del análisis termogravimétrico (TGA) para el compuesto, mientras que la línea inferior es un gráfico de la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

25 Figura 25 es un gráfico que muestra datos termográficos para AM(HS)2. La línea superior del gráfico es un gráfico del análisis termogravimétrico (TGA) para el compuesto, mientras que la línea inferior es un gráfico de la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

30 Figura 26 es un gráfico que muestra datos termográficos para la forma cristalina (I-HS). La línea superior del gráfico es un gráfico del análisis termogravimétrico (TGA) para el compuesto, mientras que la línea inferior es un gráfico de la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Figura 27 ilustra una superposición de los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de AM(HS)1, AM(HS)2 y forma cristalina (I-HS). AM(HS)1 y AM(HS)2 son las líneas anchas en la parte inferior de la figura, mientras que la forma cristalina (I-HS) exhibe picos nítidos.

Figura 28 ilustra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de AM(HS)1 y AM(HS)2.

Figura 29 ilustra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de forma cristalina (I-HS).

35 Figura 30 es una imagen de una muestra de AM(HS)1 bajo microscopía de luz polarizada con un aumento de 20X.

Figura 31 es una imagen de una muestra de AM(HS)2 bajo microscopía de luz polarizada con un aumento de 20X.

Figura 32 es una imagen de una muestra de forma cristalina (I-HS) bajo microscopía de luz polarizada con un aumento de 20X.

Figura 33 es un gráfico de la higroscopiedad de AM(HS) 1 usando sorción dinámica de vapor (DVS).

40 Figura 34 ilustra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de AM(HS)1 pre-DVS (línea superior) y post-DVS (línea inferior).

Figura 35 es un gráfico de la higroscopiedad de AM(HS)2 utilizando sorción dinámica de vapor (DVS).

Figura 36 ilustra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de AM(HS)2 pre-DVS (línea superior) y post-DVS (línea inferior).

45 Figura 37 es un gráfico de la higroscopiedad de la forma cristalina (I-HS) utilizando sorción dinámica de vapor (DVS).

Figura 38 ilustra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de forma cristalina (I-HS) pre-DVS (línea superior) y post-DVS (línea inferior).

Figura 39 es un gráfico de la resistencia a la tracción frente a la presión de compresión para diversos compactos de mezcla de compresión directa de 200 mg que incorporan forma cristalina (I-HS) o AM(HS)2. En el gráfico, (1) es una

mezcla de MCC:lactosa 2:1 con AM(HS)2; (2) es una mezcla 2:1 de MCC:lactosa con forma cristalina (I-HS); (3) es una mezcla 1:1 de MCC:almidón con AM(HS)2; (4) es una mezcla 1:1 de MCC:almidón con forma cristalina (I-HS).

Figura 40 es una superposición de termógrafos DSC de AM(HS)1 en T0 (línea inferior) y después de 5 semanas a 40 °C/75 % de HR (línea superior).

5 Figura 41 es una superposición de termografías DSC de forma cristalina (I-HS) en T0 (línea inferior) y después de 5 semanas a 40 °C/75 % de HR (línea superior).

Figura 42 ilustra una superposición de los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de AM(HS)1 en T0 (línea ancha) y después de 5 semanas a 40 °C/75 % de HR (picos nítidos).

10 Figura 43 ilustra una superposición de los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de forma cristalina (I-HS) en T0 (abajo) y después de 5 semanas a 40 °C/75 % de HR (arriba).

Figura 44 ilustra una superposición de los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de forma cristalina (I-HS) (abajo) y AM (HS)1 (arriba) después de 5 semanas a 40 °C/75 % de HR.

15 Figura 45 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en el volumen de un tumor xenográfico (humano) derivado de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón CUTO-3F (CUTO-3.29) a lo largo del tiempo en ratones que fueron tratados con vehículo (triángulos) o administrados por vía oral una dosis dde una vez al día de 60 mg/kg (círculos) o 200 mg/kg (cuadrados) de forma cristalina (I-HS) después de la implantación del xenoinjerto en los ratones.

20 Figura 46 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en el volumen de un tumor xenógrafo (humano) derivado de una línea de células KM12 de cáncer colorrectal a lo largo del tiempo en ratones que fueron tratados con vehículo (triángulos) o se les administró por vía oral una dosis diaria de 60 mg/kg (círculos) o 200 mg/kg (cuadrados) de forma cristalina (I-HS) después de la implantación del xenoinjerto en los ratones.

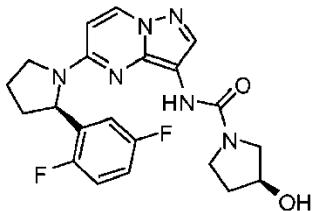
Figura 47 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en el volumen de un tumor xenográfico (humano) derivado de una línea celular de leucemia mieloide aguda MO-91 a lo largo del tiempo en ratones que fueron tratados con vehículo (triángulos) o se les administró por vía oral una dosis diaria de 60 mg/kg (círculos) o 200 mg/kg (cuadrados) de forma cristalina (I-HS) después de la implantación del xenoinjerto en los ratones.

25 Figura 48 es un gráfico que muestra el porcentaje de cambio en el volumen de un tumor xenográfico (humano) derivado de una línea celular de melanoma A375 a lo largo del tiempo en ratones que fueron tratados con vehículo (triángulos) o se les administró por vía oral una dosis diaria de 60 mg/kg (círculos) o 200 mg/kg (cuadrados) de forma cristalina (I-HS) después de la implantación del xenoinjerto en los ratones.

Descripción detallada

30 La presente divulgación se refiere a (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (Fórmula I) y a sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, la sal de sulfato de hidrógeno, y además a una novedosa forma cristalina de la sal de sulfato de hidrógeno, que presenta inhibición de la proteína tirosina quinasa de la familia Trk, composiciones farmacéuticas que las contienen y procesos para fabricar la forma cristalina.

35 En el presente documento se proporciona una novedosa forma cristalina del compuesto de Fórmula I:



I

En particular, la novedosa forma cristalina comprende la sal de sulfato de hidrógeno del compuesto de Fórmula I en una forma polimórfica estable, en lo sucesivo denominada forma cristalina (I-HS), que puede caracterizarse, por ejemplo, por su patrón de difracción de rayos X.

40 Como se ilustra en la Figura 1, en algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se puede caracterizar por su patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD). El XRPD se llevó a cabo en un difractómetro de rayos X D5000 con una fuente de tubo sellado de foco fino CuK α 1 de 0.1540562 nm de largo de Siemens escaneando muestras entre 3 y 40 °2-theta con un tamaño de paso de 0.0200 °2-theta y un tiempo por paso de 1 segundo. La velocidad de exploración efectiva fue de 0.0200 °/s con un voltaje de instrumento de 40 kV y un ajuste de corriente de 40 mA. Las muestras se

ES 2 941 630 T3

analizaron usando una rendija de divergencia que tenía un tamaño de 2 mm en modo de reflexión bajo las siguientes condiciones experimentales.

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 20 picos característicos ($20 \text{ grados} \pm 0.3$), como se indica en la Tabla 1.

5

Tabla 1. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición [°2-0]	FWHM [°2-θ]	Espaciamiento d [Å]	Intensidad relativa [%]
10.63	0.12	8.32	27.44
15.25	0.14	5.81	12.24
16.39	0.13	5.40	13.92
18.37	0.13	4.82	43.65
19.08	0.14	4.65	19.60
19.79	0.11	4.48	9.83
20.15	0.25	4.40	25.09
20.61	0.13	4.31	100.00
21.47	0.21	4.14	24.71
22.01	0.12	4.03	14.45
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52
24.35	0.21	3.65	10.05
25.58	0.13	3.48	8.11
26.48	0.17	3.36	9.76
27.50	0.14	3.24	7.70
28.17	0.17	3.16	11.60
28.58	0.19	3.12	10.85
30.77	0.29	2.90	8.48
38.47	0.21	2.34	10.97

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 8 picos característicos ($20 \text{ grados} \pm 0.3$), que comprende picos que tienen una intensidad relativa mayor o igual a aproximadamente el 15 %, como se indica en la Tabla 2.

10

Tabla 2. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición [°2-0]	FWHM [°2-θ]	Espaciamiento d [Å]	Intensidad relativa [%]
10.63	0.12	8.32	27.44
18.37	0.13	4.82	43.65
19.08	0.14	4.65	19.60
20.15	0.25	4.40	25.09
20.61	0.13	4.31	100.00
21.47	0.21	4.14	24.71
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52

ES 2 941 630 T3

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 5 picos característicos (2θ grados ± 0.3), que comprende picos que tienen una intensidad relativa mayor o igual a aproximadamente el 25 %, como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición [$^{\circ}2\text{-}\theta$]	FWHM [$^{\circ}2\text{-}\theta$]	Espaciamiento d [Å]	Intensidad relativa [%]
10.63	0.12	8.32	27.44
18.37	0.13	4.82	43.65
20.61	0.13	4.31	100.00
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52

5

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 4 picos característicos (2θ grados ± 0.3), que comprende picos que tienen una intensidad relativa mayor o igual a aproximadamente el 30 %, como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición [$^{\circ}2\text{-}\theta$]	FWHM [$^{\circ}2\text{-}\theta$]	Espaciamiento d [Å]	Intensidad relativa [%]
18.37	0.13	4.82	43.65
20.61	0.13	4.31	100.00
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52

10

En ciertas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD que es sustancialmente el mismo patrón de XRPD que se muestra en la Figura 1.

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 18.4, 20.6, 23.0 y 24.0. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 10.6, 18.4, 20.6, 23.0 y 24.0. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 10.6, 18.4, 19.1, 20.2, 20.6, 21.5, 23.0 y 24.0. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 10.6, 15.3, 16.4, 18.4, 19.1, 19.8, 20.2, 20.6, 21.5, 22.0, 23.0, 24.0, 24.4, 25.6, 26.5, 27.5, 28.2, 28.6, 30.8 y 38.5.

20 En ciertas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD que es sustancialmente el mismo patrón de XRPD que se muestra en la Figura 29.

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 20 picos característicos (2θ grados ± 0.3), como se indica en la Tabla 1.

Tabla 5. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición ($^{\circ}2\theta$)	Intensidad relativa (%)
10.76	29.85
15.38	13.22
16.52	16.46
18.50	48.07
19.22	22.92
19.92	16.05
20.26	30.80
20.74	100.00

ES 2 941 630 T3

Posición (°2θ)	Intensidad relativa (%)
21.56	23.78
22.16	15.51
23.16	32.52
24.10	33.89
24.50	12.14
25.72	8.89
26.50	10.88
27.62	8.61
28.32	11.44
28.74	10.73
30.92	8.23
38.60	8.88

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 8 picos característicos (2θ grados ± 0.3), que comprende picos que tienen una intensidad relativa mayor o igual a aproximadamente el 15 %, como se indica en la Tabla 6.

5

Tabla 6. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición (°2θ)	Intensidad relativa (%)
10.76	29.85
18.50	48.07
19.22	22.92
20.26	30.80
20.74	100.00
21.56	23.78
23.16	32.52
24.10	33.89

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 5 picos característicos (2θ grados ± 0.3), que comprende picos que tienen una intensidad relativa mayor o igual a aproximadamente el 25 %, como se indica en la Tabla 7.

10

Tabla 7. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición (°2θ)	Intensidad relativa (%)
10.76	29.85
18.50	48.07
20.74	100.00
23.16	32.52
24.10	33.89

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un patrón de XRPD con al menos los 4 picos característicos (2θ grados ± 0.3), que comprende picos que tienen una intensidad relativa mayor o igual a aproximadamente el 30 %, como se indica en la Tabla 8.

ES 2 941 630 T3

Tabla 8. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Posición ($^{\circ}2\theta$)	Intensidad relativa (%)
18.50	48.07
20.74	100.00
23.16	32.52
24.10	33.89

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 18.5, 20.7, 23.2 y 24.1. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 10.8, 18.5, 20.7, 23.2 y 24.1. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) en aproximadamente 10.8, 18.5, 19.2, 20.3, 20.7, 21.6, 23.2 y 24.1. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a aproximadamente 10.8, 15.4, 16.5, 18.5, 19.2, 19.9, 20.3, 20.7, 21.6, 22.2, 23.2, 24.1, 24.5, 25.7, 26.5, 27.6, 28.3, 28.7, 30.9 y 38.6.

En algunas realizaciones, dados los patrones de XRPD proporcionados en las Figura 1 y 29, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de XRPD (2θ grados) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Picos XRPD de forma cristalina (I-HS)

Figura 1	Figura 29	Diferencia	Promedio
10.76	10.63	0.13	10.70
15.38	15.25	0.13	15.32
16.52	16.39	0.13	16.46
18.50	18.37	0.13	18.44
19.22	19.08	0.14	19.15
19.92	19.79	0.13	19.86
20.26	20.15	0.11	20.21
20.74	20.61	0.13	20.68
21.56	21.47	0.09	21.52
22.16	22.01	0.15	22.09
23.16	23.04	0.12	23.10
24.10	23.97	0.13	24.04
24.50	24.35	0.15	24.43
25.72	25.58	0.14	25.65
26.50	26.48	0.02	26.49
27.62	27.50	0.12	27.56
28.32	28.17	0.15	28.25
28.74	28.58	0.16	28.66
30.92	30.77	0.15	30.85
38.60	38.47	0.13	38.54

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 18.4 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 . En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 . En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 20.2 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 21.5 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 , y 24.0 ± 0.2 . En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) se caracteriza por tener picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 15.3 ± 0.2 , 16.5 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 19.9 ± 0.2 , 20.2 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 21.5 ± 0.2 , 22.1 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 , 24.0 ± 0.2 , 24.4 ± 0.2 , 25.6 ± 0.2 , 26.5 ± 0.2 , 27.6 ± 0.2 , 28.2 ± 0.2 , 28.7 ± 0.2 , 30.8 ± 0.2 y 38.5 ± 0.2 .

Se entenderá que los valores 2-theta de los patrones de difracción de rayos X en polvo para la forma cristalina (I-HS) pueden variar ligeramente de un instrumento a otro y también dependiendo de las variaciones en la preparación de la muestra y la variación de un lote a otro, y así los valores citados no deben interpretarse como absolutos. También se entenderá que las intensidades relativas de los picos pueden variar dependiendo de los efectos de la orientación, de modo que las intensidades que se muestran en la traza de XRPD incluida en este documento son ilustrativas y no pretenden usarse para una comparación absoluta. En consecuencia, debe entenderse que la expresión "sustancialmente el mismo patrón de XRPD que se muestra en la Figura 1 o la Figura 29" significa que para fines de comparación, al menos el 90 % de los picos que se muestran en la Figura 1 o la Figura 29 están presentes. Debe entenderse que las posiciones relativas de los picos pueden variar ± 0.3 grados con respecto a las posiciones de los picos que se muestran en la Figura 1 o la Figura 29. Debe entenderse además que, con fines de comparación, se permite cierta variabilidad en las intensidades pico de las que se muestran en la Figura 1 y la Figura 29.

La Figura 2 ilustra un perfil de un analizador térmico diferencial/termogravimétrico simultáneo (TG/DTA) de forma cristalina (I-HS), de acuerdo con una realización. Para el análisis, se pesaron aproximadamente 5 mg de forma cristalina (I-HS) en una bandeja de aluminio abierta y se cargaron en un analizador térmico diferencial/termogravimétrico simultáneo (TG/DTA) y se mantuvieron a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se calentó a una tasa de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ desde $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo durante el cual se registró el cambio en el peso de la muestra junto con cualquier evento térmico diferencial. Se utilizó nitrógeno como gas de purga a un caudal de $100\text{ cm}^3/\text{min}$. El perfil TG/DAT de forma cristalina (I-HS) muestra una pérdida de peso inicial del 0.8 % entre $27.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $182.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de una pérdida de peso del 4.9 % en la curva TG entre $182.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $225.0\text{ }^{\circ}\text{C}$., también visto como una endotermia en la curva DTA. Estas pérdidas de peso podrían ser descomposición del material.

La Figura 3 ilustra un perfil de calorimetria diferencial de barrido (DSC) de forma cristalina (I-HS), de acuerdo con una realización. El análisis DSC de la muestra se realizó usando un calorímetro diferencial de barrido Seiko DSC6200 (equipado con un enfriador). Se pesaron aproximadamente 5 mg de forma cristalina (I-HS) en una bandeja DSC de aluminio y se selló de forma no hermética con una tapa de aluminio perforada. A continuación, se cargó el plato de muestra en un Seiko DSC6200 (equipado con un enfriador), se enfrió y se mantuvo a $25^{\circ}\text{ Celsius}$. Una vez que se obtuvo una respuesta de flujo de calor estable, la muestra y la referencia se calentaron a $270^{\circ}\text{ Celsius}$ a una tasa de escaneo de $10^{\circ}\text{ Celsius/min}$ mientras se monitorizaba la respuesta de flujo de calor resultante. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) tiene un termograma DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 3. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente como se muestra en la Figura 3" significa que las temperaturas del evento endotérmico que se muestra en la Figura 3 pueden variar en aproximadamente $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Como se muestra en la Figura 3, el termograma DSC de la forma cristalina (I-HS) indica un pequeño cambio endotérmico en la línea de base entre $122.9^{\circ}\text{ Celsius}$ y $152.8^{\circ}\text{ Celsius}$, seguido de una endotermia nítida que corresponde a la fusión de la forma cristalina (I-HS) a una temperatura de inicio de fusión de $190.8^{\circ}\text{ Celsius}$, una temperatura máxima de fusión de $197.9^{\circ}\text{ Celsius}$ y un calor de fusión de 2.415 mW . La transición que sigue a la endotermia de fusión puede deberse a la descomposición de la forma cristalina fundida (I-HS).

Las Figuras 4A y 4B ilustran imágenes de microscopía de luz polarizada (PLM) de forma cristalina (I-HS) bajo luz (A) no polarizada y (B) no polarizada, de acuerdo con algunas realizaciones. La presencia de cristalinidad (birrefringencia) se determinó utilizando un microscopio polarizador Olympus BX50, equipado con una cámara Motic y software de captura de imágenes (Motic Images Plus 2.0). Todas las imágenes se registraron utilizando el objetivo 20x. La forma cristalina (I-HS) exhibe birrefringencia cuando se examina bajo luz polarizada sin exhibir una morfología definida o aglomerados.

La Figura 5 ilustra un perfil de isoterma de sorción dinámica de vapor (DVS) de forma cristalina (I-HS), de acuerdo con una realización. Para la medición DVS, una muestra de forma cristalina (I-HS) se cicló a través de condiciones cambiantes de humedad para determinar su higroscopidad. La muestra se analizó usando un Sistema de Medición de Superficie DVS-1 Sistema de Sorción de Vapor Dinámico. Aproximadamente 10 mg de forma cristalina (I-HS) se colocaron en una bandeja de balanza de sorción de vapor de malla y se cargaron en una balanza de sorción de vapor dinámica como parte del Sistema de Medición de Superficie. Los datos se recogieron en intervalos de 1 minuto. Se utilizó nitrógeno como gas portador. La forma cristalina muestreada (I-HS) se sometió a un perfil de rampa de 20 a 90 % de humedad relativa (HR) en incrementos del 10 %, manteniendo la muestra en cada paso hasta que se logró un peso estable (99.5 % de finalización del paso). Después de completar el ciclo de sorción, la muestra se secó utilizando el mismo procedimiento, pero hasta el 0 % de HR y finalmente se llevó de vuelta al punto inicial de 20 % de HR. Se representó gráficamente el cambio de peso durante los ciclos de sorción/desorción, lo que permitió determinar la naturaleza higroscópica de la muestra.

Como se muestra en la Figura 5, la forma cristalina (I-HS) parece no ser higroscópica. Se observó un pequeño aumento de masa de aproximadamente 1.7 % entre 0 % y 90 % de HR durante el ciclo de sorción. Además, se observó una histéresis muy pequeña entre los ciclos de sorción y desorción. El patrón de XRPD de forma cristalina (I-HS) posterior al análisis de DVS (no mostrado) es similar a su patrón de XRPD anterior a DVS que se muestra en la Figura 1 o la Figura 29 indica que no se produjo ningún cambio en la forma cristalina (I-HS) durante DVS.

La Figura 6 ilustra un perfil de espectroscopia infrarroja (IR) de forma cristalina (I-HS) para el compuesto de Fórmula I, de acuerdo con una realización. La espectroscopia IR se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker ALPHA P. Se

colocó suficiente material de forma cristalina (I-HS) en el centro de la placa del espectrómetro y se obtuvo un espectro de transmitancia utilizando una resolución de 4 cm⁻¹, un tiempo de escaneo de fondo de 16 escaneos, un tiempo de escaneo de muestra de 16 escaneos y recopilación de datos de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. El espectro IR observado de la forma cristalina (I-HS) se muestra en la Figura 6.

5 La forma cristalina (I-HS) tiene una serie de propiedades que la hacen sorprendentemente superior a la forma amorfía de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (AM(HS)). Por ejemplo, la forma cristalina (I-HS) tiene propiedades que contribuyen a su fabricación y producción de un producto comercial. Como se muestra en el Ejemplo 8, la forma cristalina (I-HS) tiene mejores propiedades de flujo en comparación con el API amorfía (AM(HS)) como lo demuestra el Índice de Carr y Hausner. Por ejemplo, la forma cristalina (I-HS) presenta un valor de índice de Carr superior al 20 %. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) exhibe una relación de Hausner de menos de 1.35 (por ejemplo, un valor de entre aproximadamente 1.26 y aproximadamente 1.34). Las diferencias en las propiedades de flujo pueden dificultar el desarrollo de una forma de dosificación oral sólida para el API amorfía frente al API cristalino.

10 La forma cristalina (I-HS) también mostró una mejor estabilidad en un estudio de estabilidad acelerado realizado en una bolsa de LDPE a 40 °C/75 % de HR durante cinco semanas. Si bien ni la AM (HS) ni la forma cristalina (I-HS) exhibieron cambios significativos en los niveles de impurezas químicas durante el transcurso del estudio, el estudio sí reveló que la forma cristalina (I-HS) tiene propiedades fisicoquímicas estables. El API amorfía, por otro lado, se convirtió en una forma cristalina sustancialmente similar a la forma cristalina (I-HS) por XRPD, DSC, TGA, KF y microscopía de luz polarizada. Además, el API amorfía cambió a un polvo aglomerado con propiedades de flujo reducidas durante el transcurso de la prueba de estabilidad. Dichos cambios en las propiedades físicas del compuesto, incluido un cambio de un poder amorfía a un material cristalino y/o un polvo aglomerado con flujo reducido, durante el almacenamiento harían casi imposible fabricar una forma de dosificación oral sólida para uso del paciente basada en el compuesto amorfía. Las propiedades observadas para la forma cristalina (I-HS), sin embargo, son consistentes con las deseadas para un producto comercial, incluyendo tener una estructura física y química estable.

15 25 La forma cristalina (I-HS), como se señaló anteriormente, no es higroscópica. Tal como se usa en el presente documento, "no higroscópico" se refiere a un compuesto que muestra un aumento de peso inferior al 2 % a 25 °C y una HR del 80 % después de 24 a 48 horas (véase, por ejemplo, el Ejemplo 10). Sin embargo, se encontró que el compuesto AM(HS) se delicuescía tras la exposición a la humedad. Dada esta tendencia, el uso del compuesto AM(HS) requeriría importantes precauciones de manejo durante el almacenamiento y la fabricación para evitar que ocurra este cambio de forma, mientras que la forma cristalina (I-HS) no requiere tales precauciones durante la fabricación del API. También se esperaría que esta estabilidad a la humedad se trasladara a cualquier producto sólido de dosificación oral preparado utilizando la forma cristalina (I-HS).

20 30 Finalmente, la forma cristalina (I-HS) proporciona un perfil de impurezas significativamente mejorado en comparación con el API amorfía. La capacidad de controlar un perfil de impurezas es importante para la seguridad del paciente, el desarrollo de un proceso de fabricación repetible y el cumplimiento de los requisitos de las Agencias Reguladoras antes de su uso en humanos.

35 Los compuestos proporcionados en el presente documento, incluidos (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (Fórmula I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, la sal de sulfato de hidrógeno y, además, una novedosa forma cristalina de la sal de sulfato de hidrógeno (forma cristalina (I-HS)), presentan inhibición de la proteína tirosina quinasa de la familia Trk, y el compuesto, la sal de sulfato de hidrógeno, y su forma cristalina se puede usar en el tratamiento del dolor, la inflamación, el cáncer y ciertas enfermedades infecciosas.

40 45 50 Algunas realizaciones incluyen el uso de la forma cristalina (I-HS) para el tratamiento de trastornos y enfermedades que pueden tratarse mediante la inhibición de las quinasas TrkA, TrkB y/o TrkC, tales como una condición mediada por TrkA, TrkB y/o TrkC, tales como una o más condiciones descritas en este documento, incluido un cáncer asociado a Trk. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) también puede ser útil en el tratamiento del dolor, incluido el dolor agudo y crónico. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) puede ser útil en el tratamiento de múltiples tipos de dolor que incluyen dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor quirúrgico y dolor asociado con cáncer, cirugía y fractura ósea. Además, la forma cristalina (I-HS) puede ser útil para tratar inflamaciones, enfermedades neurodegenerativas activas y crónicas y ciertas enfermedades infecciosas. La presente divulgación se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina (I-HS). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende la forma cristalina (I-HS) y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 La capacidad de la forma cristalina (I-HS) para actuar como inhibidores de TrkA, TrkB y/o TrkC puede demostrarse mediante los ensayos descritos en los Ejemplos A y B como se describe en la Patente U.S. No. 8,513,263, emitida el 20 de agosto de 2013.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para tratar a un paciente diagnosticado con un cáncer asociado con TRK, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de fórmula I o una sal del mismo, tal como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263). La familia Trk de receptores de neurotrofinas, TrkA,

TrkB y TrkC (codificados por los genes NTRK1, NTRK2 y NTRK3, respectivamente) y sus ligandos de neurotrofinas regulan el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las neuronas. Desregulación en un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, como translocaciones que involucran el dominio quinasa NTRK, mutaciones que involucran el sitio de unión al ligando TRK, amplificaciones de un gen NTRK, variantes de empalme de ARNm Trk, y la señalización autocrina/paracrina de Trk se describen en un número diverso de tipos de tumores y pueden contribuir a la tumorigénesis. Recientemente se describieron fusiones de NTRK1 en un subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón con adenocarcinoma². Las translocaciones en NTRK1, NTRK2 y NTRK3 que conducen a la producción de proteínas de fusión TrkA, TrkB y TrkC constitutivamente activas son oncogénicas y prevalentes en una amplia gama de tipos de tumores, incluidos adenocarcinoma de pulmón, tiroides, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, y otros.

En algunas realizaciones, la desregulación en un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye la sobreexpresión de TrkA, TrkB o TrkC de tipo salvaje (por ejemplo, que conduce a la activación autocrina). En algunas realizaciones, la desregulación en un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye sobreexpresión, activación, amplificación o mutación en un segmento cromosómico que comprende el gen NTRK1, NTRK2 o NTRK3 o una porción del mismo. En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye una o más translocaciones o inversiones cromosómicas que dan como resultado fusiones de genes NTRK1, NTRK2 o NTRK3, respectivamente. En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, es el resultado de translocaciones genéticas en las que la proteína expresada es una proteína de fusión que contiene residuos de una proteína asociada que no es TrkA. y TrkA, una proteína asociada no TrkB y TrkB, o una proteína asociada no TrkC y proteínas TrkC, e incluyen un mínimo de un dominio quinasa TrkA, TrkB o TrkC funcional, respectivamente.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión de TrkA es una de las proteínas de fusión de TrkA que se muestran en la Tabla 10, donde:

25

Tabla 10. Proteínas y cánceres de fusión TrkA de ejemplo

Proteína de fusión	Asociado de fusión que no es de TrkA	Trk de ejemplo no limitante y sinónimos de cánceres asociados
TP53-TrkA ^{1,11}	Proteína tumoral P53	Melanoma de Spitzoid, tumores de Spitz
LMNA-TrkA ^{1,12}	Lamin A/C	Melanoma de Spitzoid, tumores de Spitz, sarcoma indiferenciado, sarcoma de tejido blando en adultos (por ejemplo, sarcoma de tejido blando metastásico a pulmón), fibrosarcoma de tejido blando
CD74-TrkA ²	Cadena invariable MHC clase II	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
		adenocarcinoma pulmonar
TFG-TrkA (TRK-T3) ³	Gen fusionado con TRK	Carcinoma papilar de tiroides (PTC), tumor fibroso solitario de tejido blando
TPM3-TrkA ³	Tropomiosina 3	Cáncer de pulmón, carcinoma papilar de tiroides (PTC), leucemia mieloide aguda (AML), sarcoma, gliomas pediátricos, cáncer colorrectal (CRC), Schwannoma de tejido blando
NFASC-TrkA ⁴	Neurofascina	Glioblastoma multiforme (GBM); Glioblastoma
BCAN-TrkA ⁴	Brevican	Glioblastoma multiforme (GBM)
MPRIP-TrkA ⁵	Proteína de interacción Rho de Miosina fosfatasa o Proteína de interacción Rho 3	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), Adenocarcinoma de pulmón
TPR-TrkA (TRK-T1 o TRK-T2) ³	Región promotora translocada, proteína de canasta nuclear	Carcinoma papilar de tiroides (PTC), cáncer colorrectal (CRC) ^A , Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
RFWD2-TrkA ⁶	Dedo anular y dominio de repetición WD 2	Cáncer de neuroendrocina de células grandes (LCNEC); NSCLC

Proteína de fusión	Asociado de fusión que no es de TrkA	Trk de ejemplo no limitante y sinónimos de cánceres asociados
IRF2BP2-TrkA ⁷	Factor regulador de interferón 2 Proteína de unión 2	Cáncer de tiroides; Carcinoma de la glándula tiroides
SQSTM1-TrkA ⁷	Sequestosoma 1	Cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer de tiroides papilar), carcinoma de glándula tiroides, fibrosarcoma de tejido blando
SSBP2-TrkA ⁷	Proteína 2 de unión a ADN monocatenario	cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer de tiroides papilar); Carcinoma de la glándula tiroides
RABGAP1L-TrkA ⁸	Proteína activadora de GTPasa RAB similar a 1	Colangicarcinoma Intrahepático (ICC)
C18ORF8-TrkA ⁹	Cromosoma 18 Marco de lectura abierto 8	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
RNF213-TrkA ⁹	Proteína del dedo anular 213	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
TBC1D22A-TrkA ⁹	Familia de dominios TBC1, miembro 22A	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
C20ORF112-TrkA ⁹	Cromosoma 20 Marco de lectura abierto 112	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
DNER-TrkA ⁹	Conteniendo Repetición de EGF similar a Delta/Notch	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)
ARHGEF2-TrkA ¹³	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho 2	Glioblastoma
CHTOP-TrkA ¹³	Objetivo de cromatina de PRMT1	Glioblastoma
PPL-TrkA ¹³	periplaquina	Carcinoma de tiroides
PLEKHA6-TrkA	Miembro 6 de la familia A que contiene el dominio de homología de Pleckstrin	
PEAR1-TrkA	Receptor de agregación endotelial plaquetaria 1	
MRPL24-TrkA	39S Proteína Ribosomal L24, Mitocondrial	
MDM4-TrkA	Homólogo Humano de Ratón Doble Minuto 4	
LRRC71-TrkA	71 conteniendo repetición rica en leucina	
GRIPAP1-TrkA	Proteína 1 asociada a GRIP1	
EPS15-TrkA	Sustrato del receptor del factor de crecimiento epidérmico 15	
DYNC2H1-TrkA ^B	Dineína, citoplasmática 2, cadena pesada 1	Sarcoma
CEL-TrkA	Carboxil éster lipasa	Muestra de adenocarcinoma de páncreas ^D
EPHB2-TrkA ^B	EPH Receptor B2	Glioma de bajo grado
TGF-TrkA ^C	Factor de crecimiento transformador	Cáncer papilar de tiroides

Proteína de fusión	Asociado de fusión que no es de TrkA	Trk de ejemplo no limitante y sinónimos de cánceres asociados
^A Créancier et al., Cancer Lett. 365(1):107-111, 2015.		
^B U.S. Patent Application Publication No. 2015/0315657.		
^C U.S. Patent Application Publication No. 2015/0283132.		
^D Egren et al., Cancer Res. 75(15 Supplement): 4793, 2015.		

En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye una o más delecciones, inserciones o mutaciones puntuales en una proteína TrkA. En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, 5 incluye una delección de uno o más residuos de la proteína TrkA, lo que da como resultado una actividad constitutiva del dominio quinasa TrkA. En algunas realizaciones, la delección incluye una delección de los aminoácidos 303-377 en la isoforma 2 de TrkA.

En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel 10 del mismo, incluye al menos una mutación puntual en un gen NTRK1 que da como resultado la producción de una proteína TrkA que tiene uno o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la proteína TrkA de tipo salvaje (véanse, por ejemplo, las mutaciones puntuales enumeradas en la Tabla 11).

Tabla 11. Activación de mutaciones puntuales de TrkA

Mutación puntual	Razón fundamental
R33W ¹	
A336E	Cerca del sitio de unión de NGF
A337T	Cerca del sitio de unión de NGF
R324Q o R324W	Cerca del sitio de unión de NGF
V420M	Cerca de la membrana
R444Q o R444W	Cerca de la membrana
G517R o G517V	Bucle P
K538A	Activando
R649W o R649L	La arginina puede estabilizar la conformación autoinhibida.
R682S	Bucle de activación
V683G	Bucle de activación
R702C	Expuesto, puede formar un dímero con enlaces disulfuro cara a cara
C1879T ²	

¹ Zhang et al., Blood 124(21):1682, 2014. Mutation found in T-cell prolymphocytic leukemia.

² Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112(40):12492-12497, 2015. Mutation found in colorectal cancer.

En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel 15 del mismo, incluye una variación de empalme en un ARNm de TrkA que da como resultado una proteína expresada que es una variante empalmada alternativamente de TrkA que tiene al menos al menos un residuo eliminado (en comparación con una proteína TrkA de tipo salvaje) dando como resultado una actividad constitutiva del dominio quinasa TrkA. En algunas realizaciones, una forma alternativamente empalmada de TrkA con actividad constitutiva tiene delecciones de los exones 8, 9 y 11 que dan como resultado una proteína expresada a la que le faltan los residuos 20 192-284 y 393-398 en relación con la isoforma 2 de TrkA, tiene una delección del exón 10 en TrkA, o tiene una delección en un gen NTRK1 que codifica una proteína TrkA con una delección de 75 aminoácidos en el dominio transmembrana (Reuther et al., Mol. Cell Biol. 20:8655-8666, 2000).

Los cánceres identificados que tienen una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, 25 o nivel de los mismos (véanse las referencias citadas en este documento y también los sitios web www.cancer.gov y www.nccn.org) incluyen:

(A) Cánceres en los que la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye una o más translocaciones cromosómicas o inversiones que dan como resultado proteínas de fusión TrkA, por ejemplo, que incluyen:

Cáncer	Estándar de cuidado
Cáncer de pulmón de células no pequeñas ²	radioterapia (por ejemplo, terapia con yodo radiactivo, radiación de haz externo o terapia con radio 223), quimioterapia como agentes únicos (por ejemplo, dimaleato de afatinib, bevacizumab, carboplatino, cetuximab, cisplatino, crizotinib, erlotinib, gefitinib, gemcitabina,
	metotrexato, paclitaxel o pemetrexed) o combinaciones (por ejemplo, carboplatino-paclitaxel, gemcitabina-paclitaxel o quimiorradiación)
Carcinoma papilar de tiroides ¹⁴	Radioterapias (por ejemplo, terapia con yodo radiactivo o radiación de haz externo) y quimioterapia (por ejemplo, sorafenib, sunitinib o pazopanib)
Glioblastoma multiforme ¹⁵	Quimioterapéuticos (por ejemplo, bevacizumab, everolimus, lomustina o temozolomida)
Carcinoma colorrectal ¹⁶	Quimioterapéuticos como agentes únicos (por ejemplo, afilibercept, bevacizumab, capecitabina, cetuximab, fluorouracilo, irinotecán, leucovorina, oxaliplatino, panitumumab o regorafenib) o combinaciones (por ejemplo, folfox, folfiri, capox, folfiri-bevacizumab, folfiri-cetuximab o xelox)
Melanoma ¹²	Quimioterapéuticos (por ejemplo, aldesleukina, dabrafenib, dacarbazine, interferón alfa-2b, ipilimumab, peginterferón alfa-2b, trametinib o vemurafenib)

5 (B) Cánceres en los que la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye una o más delecciones, inserciones o mutaciones en la proteína TrkA, por ejemplo, que incluyen:

Cáncer	Estándar de cuidado
Leucemia mieloide aguda ^{17, 18}	Quimioterapéuticos como agentes únicos (por ejemplo, trióxido de arsénico, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, doxorrubicina o vincristina) o combinaciones (por ejemplo, ADE)
Cáncer neuroendocrino de células grandes ¹⁹	Radioterapia (por ejemplo, terapia con yodo radiactivo, radiación de haz externo o terapia con radio 223) y/o quimioterapia (por ejemplo, cisplatino, carboplatino o etopósido)
Neuroblastoma ²⁰	Quimioterapéuticos (por ejemplo, ciclofosfamida, doxorrubicina o vincristina)

(C) Cánceres en los que la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye la sobreexpresión de TrkA de tipo salvaje (activación autocrina), por ejemplo, que incluye:

Cáncer	Estándar de cuidado
carcinoma de próstata ^{21, 22}	Radioterapia (por ejemplo, terapia con radio 223) o quimioterapia (por ejemplo, abiraterona, cabazitaxel, degarelix, denosumab, docetaxel,
	enzalutamida, leuprolida, prednisona o sipuleucel-T)
Neuroblastoma ²³	Quimioterapéuticos (por ejemplo, ciclofosfamida, doxorrubicina o vincristina)

Cáncer	Estándar de cuidado
Cáncer de páncreas ²⁴	Quimioterapéuticos como agentes únicos (por ejemplo, erlotinib, fluorouracilo, gemcitabina o mitomicina C) o combinaciones (por ejemplo, gemcitabina-oxaliplatino)
Melanoma ²⁵	Quimioterapéuticos (por ejemplo, aldesleukina, dabrafenib, dacarbazine, interferón alfa-2b, ipilimumab, peginterferón alfa-2b, trametinib o vemurafenib)
Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello ²⁶	Radioterapia y/o quimioterapia (por ejemplo, bleomicina, cetuximab, cisplatino, docetaxel, fluorouracilo o metotrexato)
Cáncer gástrico ²⁷	Quimioterapéuticos (por ejemplo, docetaxel, doxorrubicina, fluorouracilo, mitomicina C o trastuzumab)

En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye una translocación que da como resultado la expresión de una proteína de fusión TrkB, por ejemplo, una de las proteínas de fusión TrkB que se muestran en Tabla 12.

5

Tabla 12. Proteínas y cánceres de fusión TrkB ejemplares

Proteína de fusión	Asociado de fusión que no es TrkB	TrkB de ejemplo no limitantes y sinónimos de cánceres asociados
NACC2-TrkB ¹⁰	Miembro de la familia NACC 2, Conteniendo dominio BEN y BTB (POZ)	Astrocitoma pilocítico
QKI-TrkB ¹⁰	Conteniendo dominio QKI, KH, unión a ARN	Astrocitoma pilocítico
AFAP1-TrkB ⁷	Proteína 1 asociada al filamento de actina	Glioma de bajo grado
PAN3-TrkB ⁷	Subunidad de ribonucleasa específica de poli(A) PANS	Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
SQSTM1-TrkB ⁷	Sequestosoma 1	Glioma de bajo grado
TRIM24-TrkB ⁷	24 que contiene Motivo tripartito	Adenocarcinoma de pulmón
VCL-TrkB ¹¹	vinculina	Gliomas pediátricos
AGBL4-TrkB ¹¹	Proteína de unión a ATP/GTP similar a 4	Gliomas pediátricos
DAB2IP-TrkB	Proteína que interactúa con el homólogo 2 deshabilitado	

En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluye una translocación que da como resultado la expresión de una proteína de fusión TrkC, por ejemplo, una de las proteínas de fusión TrkC que se muestran en Tabla 13.

10

Tabla 13. Cánceres y proteínas de fusión TrkC de ejemplo

Proteína de fusión	Asociado de fusión que no es TrkB Fusion	Trk de ejemplo no limitantes y sinónimos de cánceres asociados
ETV6-TrkC ¹¹	ETS Variante 6	Cáncer de glándulas salivales, carcinoma secretor de mama, leucemia mieloide aguda, fibrosarcoma, nefroma, melanoma, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de mama, gliomas pediátricos, cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer papilar de tiroides), fibrosarcoma infantil, hemangioma de tejido blando, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) (por ejemplo, GIST c-kit-negativo), Carcinoma mamario (por ejemplo, Carcinoma secretor análogo mamario)
BTBD1-TrkC ¹¹	1 que contiene dominio BTB (POZ)	Gliomas pediátricos
LYN-TrkC ⁷	Homólogo de oncogén relacionado con el virus del sarcoma de Yamaguchi V-Yes-1 (también conocido como proteína tirosina quinasa novedosa relacionada con Lck/Yes)	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
RBPMS-TrkC ⁷	Proteína de unión a ARN con empalme múltiple	Cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer de tiroides papilar)
EML4-TrkC ^B	Proteína asociada a microtúbulos de equinodermo similar a 4	fibrosarcoma
HOMER2-TrkC	homólogo 2 de la proteína homer	Sarcoma de tejido blando
TFG-TrkC	Gen fusionado con TRK	Tumor fibroso solitario de tejido blando
FAT 1-TrkC		Carcinoma de células escamosas de cuello uterino ^C
TEL-TrkC		Fibrosarcoma congénito, leucemia mielógena aguda

^B Tannenbaum et al., Cold Spring Harb. Mol. Case Stud. 1:a000471, 2015.
^C U.S. Patent Application Publication No. 2015/0315657.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para tratar a un paciente diagnosticado con un cáncer asociado a Trk, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo, tal como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263). Por ejemplo, el cáncer asociado a Trk puede seleccionarse del grupo de: cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma papilar de tiroides, glioblastoma multiforme, leucemia mieloide aguda, carcinoma colorrectal, carcinoma neuroendocrino de células grandes, cáncer de próstata, neuroblastoma, carcinoma pancreático, melanoma, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma gástrico, cáncer de Spitz, carcinoma papilar de tiroides, cáncer de colon, leucemia mieloide aguda, sarcoma, glioma pediátrico, colangiocarcinoma intrahepático, astrocitoma pilocítico, glioma de bajo grado, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de glándula salival, mama secretora cáncer, fibrosarcoma, nefroma y cáncer de mama.

5 En algunas realizaciones, un cáncer asociado a Trk se selecciona del grupo de: ejemplos no limitantes de cánceres asociados a TRK incluyen: Melanoma spitzoid, tumores de Spitz (por ejemplo, tumores de Spitz metastásicos), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides (PTC)), leucemia mieloide aguda (AML), sarcoma (por ejemplo, sarcoma indiferenciado o sarcoma de tejidos blandos en adultos), gliomas pediátricos, cáncer colorrectal (CRC), glioblastoma multiforme (GBM), cáncer neuroendocrino de células grandes (LCNEC), cáncer de tiroides, colangiocarcinoma intrahepático (ICC), astrocitoma pilocítico, glioma de bajo grado, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, adenocarcinoma (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de glándulas salivales, carcinoma secretor de mama, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, fibrosarcoma, nefroma, melanoma, carcinoma broncogénico, cáncer de células B, cáncer de bronquios, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de tejidos hematológicos, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de glándulas salivales, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer testicular, o cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino o endometrial, tumores miofibroblásticos inflamatorios, tumor del estroma gastrointestinal, linfoma no Hodgkin, neuroblastoma, cáncer de

10
15
20
25

En algunas realizaciones, un cáncer asociado a Trk se selecciona del grupo de: ejemplos no limitantes de cánceres asociados a TRK incluyen: Melanoma spitzoid, tumores de Spitz (por ejemplo, tumores de Spitz metastásicos), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma de tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides (PTC)), leucemia mieloide aguda (AML), sarcoma (por ejemplo, sarcoma indiferenciado o sarcoma de tejidos blandos en adultos), gliomas pediátricos, cáncer colorrectal (CRC), glioblastoma multiforme (GBM), cáncer neuroendocrino de células grandes (LCNEC), cáncer de tiroides, colangiocarcinoma intrahepático (ICC), astrocitoma pilocítico, glioma de bajo grado, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, adenocarcinoma (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón), cáncer de glándulas salivales, carcinoma secretor de mama, cáncer de mama, leucemia mieloide aguda, fibrosarcoma, nefroma, melanoma, carcinoma broncogénico, cáncer de células B, cáncer de bronquios, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de tejidos hematológicos, cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de glándulas salivales, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer testicular, o cáncer de vejiga urinaria, cáncer uterino o endometrial, tumores miofibroblásticos inflamatorios, tumor del estroma gastrointestinal, linfoma no Hodgkin, neuroblastoma, cáncer de

pulmón de células pequeñas, carcinoma de células escamosas, cáncer esofágico-gástrico, cáncer de piel, neoplasia (por ejemplo, una neoplasia melanoquística), Spitz nevi, astrocitoma, meduloblastoma, glioma, tumores neuroendocrinos de células grandes, cáncer de hueso y carcinoma de recto.

- 5 En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento son útiles para tratar cánceres asociados con Trk en pacientes pediátricos. Por ejemplo, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden usarse para tratar sarcoma infantil, neuroblastoma, nefroma mesoblástico congénito, glioma cerebral de bajo grado y glioma pontino.
- 10 En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento son útiles para tratar un cáncer asociado a Trk en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales o terapias que funcionan mediante el mismo mecanismo de acción o uno diferente.
- 15 En algunas realizaciones, el (los) agente (s) terapéutico (s) adicional (es) se selecciona (n) del grupo de: agentes terapéuticos dirigidos al receptor tirosina quinasa, incluidos cabozantinib, crizotinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, pazopanib, pertuzumab, regorafenib, sunitinib y trastuzumab.
- 20 En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de inhibidores de la ruta de transducción de señales, incluidos, por ejemplo, inhibidores de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK (por ejemplo, sorafenib, trametinib o vemurafenib), inhibidores de la ruta PI3K-Akt-mTOR-S6K (por ejemplo, everolimus, rapamicina, perifosina o temsirolimus) y moduladores de la ruta de la apoptosis (por ejemplo, obataclax).
- 25 En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo de quimioterápicos citotóxicos, que incluyen, por ejemplo, trióxido de arsénico, bleomicina, cabazitaxel, capecitabina, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazine, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, etopósido, fluorouracilo, gemcitabina, irinotecán, lomustina, metotrexato, mitomicina C, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, temozolomida y vincristina.
- 30 En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo de terapias dirigidas a la angiogénesis, que incluyen, por ejemplo, afibbercept y bevacizumab.
- 35 En algunas realizaciones, el (los) agente (s) terapéutico (s) adicional (es) se selecciona (n) del grupo de agentes inmunodirigidos, por ejemplo, que incluyen aldesleucina, ipilimumab, lambrolizumab, nivolumab y sipuleucel-T.
- 40 En algunas realizaciones, el (los) agente (s) terapéutico (s) adicional (es) se selecciona (n) de agentes activos contra la ruta de Trk corriente abajo, incluidos, por ejemplo, productos biofarmacéuticos dirigidos a NGF, como anticuerpos contra NGF e inhibidores de panTrk.
- 45 En algunas realizaciones, la terapia o el agente terapéutico adicional es radioterapia, que incluye, por ejemplo, terapia con yoduro radiactivo, radiación de haz externo y terapia con radio 223.
- 50 En algunas realizaciones, el (los) agente (s) terapéutico (s) adicional (es) incluye (n) cualquiera de las terapias enumeradas anteriormente o agentes terapéuticos que son estándares de atención en cánceres en los que el cáncer tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos.
- 55 Los métodos para detectar la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, incluyen, por ejemplo, la detección de translocaciones del gen NTRK, por ejemplo, usando hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (por ejemplo, como se describe en las Solicitudes Internacionales Nos. PCT/US2013/061211 PCT/US2013/057495).
- 60 En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para tratar el cáncer (por ejemplo, un cáncer asociado con Trk) en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, tal como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) en combinación con al menos una terapia o agente terapéutico adicional. En algunas realizaciones, la al menos una terapia o agente terapéutico adicional se selecciona de radioterapia (por ejemplo, terapia con yoduro de radio, radiación de haz externo o terapia con radio 223), quimioterápicos citotóxicos (por ejemplo, trióxido de arsénico, bleomicina, cabazitaxel, capecitabina, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazine, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, etopósido, fluorouracilo, gemcitabina, irinotecán, lomustina, metotrexato, mitomicina C, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, temozolomida o vincristina), terapias dirigidas a la tirosina quinasa (por ejemplo, afatinib, cabozantinib, cetuximab, crizotinib, dabrafenib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, pazopanib, panitumumab, pertuzumab, regorafenib, sunitinib o trastuzumab), moduladores de la apoptosis e inhibidores de la transducción de señales (por ejemplo, everolimus, perifosina, rapamicina, sorafenib, temsirolimus, trametinib o vemurafenib), terapias inmunodirigidas (por ejemplo, aldesleukina, interferón alfa-2b, ipilimumab, lambrolizumab, nivolumab, prednisona o sipuleucel-T) y terapias dirigidas a la angiogénesis (por ejemplo, afibbercept o bevacizumab), en las que la cantidad de un compuesto proporcionado en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es, en combinación con la terapia adicional o el agente terapéutico, es eficaz en el tratamiento de dicho cáncer.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de Trk diferente. Los ejemplos no limitantes de otros inhibidores de Trk incluyen una imadazopiridazina sustituida con (R)-2-fenilpirrolidina, AZD6918, GNF-4256, GTx-186, GNF-5837, AZ623, AG-879, altiratinib, CT327, AR-772, AR-523, AR-786, AR-256, AR-618, AZ-23, AZD7451, cabozantinib, CEP-701, CEP-751, PHA-739358, dovitinib, entrectinib, PLX7486, Gö 6976, GW441756, MGCD516, ONO-5390556, PHA-848125AC, regorafenib, sorafenib, sunitinib, TSR-011, VM-902A, K252a, una 4-aminopirazolilpirimidina y un compuesto de pirazolo[1,5-a]pirimidina sustituido.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales incluyen: agentes terapéuticos dirigidos al receptor tirosina quinasa, tales como afatinib, cabozantinib, cetuximab, crizotinib, dabrafenib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, lestaurtinib, nilotinib, pazopanib, panitumumab, pertuzumab, sunitinib, trastuzumab, AG 879, AZ-23, AZ623, Gö 6976, GNF-5837, GTx-186, GW 441756, MGCD516, RPI-1, RXDX101 y TSR-011; agentes terapéuticos dirigidos a RET, como alectinib, apatinib, cabozantinib, dovitinib, lenvatinib, motesanib, nintedanib, ponatinib, regorafenib, sunitinib, sorafenib, vatalanib, vandetanib, AUY-922, BLU6864, DCC-2157, MGCD516, NVP-AST487, PZ-1, RXDX105, SPP86, TG101209 y XL-184; inhibidores de la ruta de transducción de señales, como los inhibidores de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK (por ejemplo, binimetinib, selumetinib, encorafenib, sorafenib, trametinib y vemurafenib), inhibidores de la ruta PI3K-Akt-mTOR-S6K (por ejemplo, everolimus, rapamicina, perifosina, temsirolimus), otros inhibidores de la quinasa, como baricitinib, brigatinib, capmatinib, danusertib, ibrutinib, milciclib, quercetina, regorafenib, ruxolitinib, semaxanib, AP32788, BLU285, BLU554, INCB39110, INCB40093, INCB50465, INCB52793, INCB54828, MGCD265, NMS-088, NMS-1286937, PF 477736, PLX3397, PLX7486, PLX8394, PLX9486, PRN1008, PRN1371, RXDX103, RXDX106, RXDX108, y TG101209; inhibidores de puntos de control, como ipilimumab, tremelimumab, nivolumab, pidilizumab, MPDL3208A, MEDI4736, MSB0010718C, BMS-936559, BMS-956559, BMS-935559 (MDX-1105), AMP-224 y pembrolizumab; moduladores de la ruta de la apoptosis (por ejemplo, obataclax); quimioterápicos citotóxicos, como trióxido de arsénico, bleomicina, cabazitaxel, capecitabina, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazine, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, etopósido, fluorouracilo, gemcitabina, irinotecán, lomustina, metotrexato, mitomicina C, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, temozolomida y vincristina; terapias dirigidas a la angiogénesis, como afibercept y bevacizumab; agentes inmunodirigidos, como aldesleukina, interferón alfa-2b, ipilimumab, lambrolizumab, nivolumab, prednisona, sipuleucel-T; radioterapia, como la terapia con yoduro radiactivo, la radiación de haz externo y la terapia con radio 223.

Otros agentes terapéuticos adicionales incluyen inhibidores de RET como los descritos, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 8,299,057; 8,399,442; 8,937,071; 9,006,256; y 9,035,063; Publicaciones U.S. No. 2014/0121239; 2011/0053934; 2011/0301157; 2010/0324065; 2009/0227556; 2009/0130229; 2009/0099167; 2005/0209195; Publicación Internacionales Nos. WO 2014/184069; WO 2014/072220; WO 2012/053606; WO 2009/017838; WO 2008/031551; WO 2007/136103; WO 2007/087245; WO 2007/057399; WO 2005/051366; y WO 2005/044835; y J. Med.Chem. 2012, 55 (10), 4872-4876.

Estos agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse con uno o más compuestos proporcionados en el presente documento como parte de formas de dosificación iguales o separadas, a través de vías de administración iguales o diferentes, y en los mismos o diferentes programas de administración de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar conocida por un experto en la técnica.

También se proporciona en el presente documento (i) una combinación farmacéutica para tratar el cáncer (por ejemplo, un cáncer asociado a Trk) en un paciente que lo necesite, que comprende (a) la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263), (b) un agente terapéutico adicional y (c) opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento de una enfermedad tumoral, en donde las cantidades del compuesto o sal del mismo y del agente terapéutico adicional juntos son efectivos en el tratamiento de dicho cáncer; (ii) una composición farmacéutica que comprende tal combinación; (iii) el uso de dicha combinación para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, un cáncer asociado a Trk); y (iv) un paquete o producto comercial que comprende una combinación tal como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial; ya un método de tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer asociado a Trk) en un paciente que lo necesite.

También se proporcionan métodos para tratar a un sujeto identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk (por ejemplo, un sujeto que ha sido identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk mediante el uso de un organismo regulador aprobado, por ejemplo, kit aprobado por la FDA para identificar la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, en un sujeto o una muestra de biopsia del sujeto) (por ejemplo, cualquiera de los cánceres asociados con Trk descritos en este documento o conocidas en la técnica) que incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263). También se proporciona la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para su uso en el tratamiento de un cáncer asociado a Trk en un sujeto identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk (por ejemplo, un sujeto que ha sido identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk mediante el uso de una agencia reguladora aprobada, por ejemplo, kit aprobado por la FDA para identificar la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, en un sujeto o una muestra de biopsia del sujeto) (por ejemplo, cualquiera de los cánceres asociados a Trk descritos en el presente documento o conocidos

en la técnica). También se proporciona el uso de la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer asociado a Trk en un sujeto identificado o diagnosticado con cáncer asociado a Trk (por ejemplo, un sujeto que ha sido identificado o diagnosticado con cáncer asociado a Trk mediante el uso de un kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA, para identificar la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, en un sujeto o una muestra de biopsia del sujeto) (por ejemplo, cualquiera de los cánceres asociados a Trk descritos en el presente documento o conocidos en la técnica).

10 También se proporcionan métodos para tratar a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer asociado a Trk, un sujeto que presenta uno o más síntomas de un cáncer asociado a Trk, o un sujeto que tiene un riesgo elevado de desarrollar un cáncer asociado a Trk) que incluyen la realización de un ensayo (por ejemplo, un ensayo que utiliza secuenciación de última generación, inmunohistoquímica o análisis FISH de ruptura) (por ejemplo, utilizando un kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, y administrar (por ejemplo, administrar específica o selectivamente) una cantidad terapéuticamente efectiva de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) a un sujeto que se determina que tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o niveles de los mismos. En el presente documento se describen ensayos adicionales, ensayos no limitantes que pueden usarse en estos métodos. También se conocen en la técnica ensayos adicionales. También se proporciona el uso de la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para su uso en el tratamiento de un cáncer asociado a Trk en un sujeto identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk a través de un paso de realizar un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) (por ejemplo, un ensayo que utiliza secuenciación de próxima generación, inmunohistoquímica, o análisis FISH de ruptura) (por ejemplo, utilizando un kit aprobado por la agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk o expresión o actividad, o nivel del mismo, donde la presencia de desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, identifica que el sujeto tiene un cáncer asociado a Trk. También se proporciona el uso de la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer asociado a Trk en un sujeto identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk a través de un paso de realizar un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) (por ejemplo, un ensayo que utiliza el siguiente secuenciación de generación, inmunohistoquímica o análisis FISH de ruptura) (por ejemplo, utilizando un kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una Trk proteína, o expresión o actividad, o nivel del mismo, donde la presencia de desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, identifica que el sujeto tiene un cáncer asociado a Trk. Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente incluyen además el registro en el registro clínico del sujeto (por ejemplo, un medio legible por ordenador) que el sujeto determinó que tenía una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, a través de la realización del ensayo, debe administrarse una forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263).

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente documento, el sujeto ha sido identificado o diagnosticado con cáncer con desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, según lo determinado utilizando un ensayo o kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente documento, el sujeto tiene un tumor que es positivo para la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, según se determina usando un ensayo o kit aprobado por agencia). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente documento, el sujeto puede ser un sujeto con un tumor que es positivo para la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, identificado como positivo utilizando un ensayo o kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente documento, el sujeto puede ser un sujeto cuyos tumores tienen una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o un nivel de la misma (por ejemplo, donde el tumor es identificado como tal utilizando un kit o ensayo aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente documento, se sospecha que el sujeto tiene un cáncer asociado a Trk. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en este documento, el sujeto tiene un registro clínico que indica que el sujeto tiene un tumor que tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (y opcionalmente la historia clínica indica que el sujeto debe ser tratado con alguna de las composiciones proporcionadas en este documento).

También se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) a un sujeto que tenga un historial clínico que indique que el sujeto tiene desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos. También se proporciona el uso de la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer asociado a Trk en un sujeto que tenga un registro clínico que indique que el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos. También se proporciona el uso de la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer asociado a Trk en un sujeto que tenga un registro clínico que indique que el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos. Algunas realizaciones de estos métodos y usos pueden incluir además: un paso para realizar un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) (por ejemplo, un ensayo que utiliza secuenciación de próxima generación, inmunohistoquímica o análisis FISH de ruptura) (por ejemplo, utilizando un regulador aprobado por agencia, por ejemplo, kit aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, y registrar la información en el expediente clínico de un sujeto (por ejemplo, un medio legible por ordenador) de que se ha identificado que el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos.

También se proporcionan métodos (por ejemplo, métodos *in vitro*) para seleccionar un tratamiento para un sujeto que incluyen la selección de un tratamiento que incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de fórmula I o una de sus sales, tales como como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para un sujeto identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk (por ejemplo, un sujeto que ha sido identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk mediante el uso de un kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA, para identificar la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, en un sujeto o una muestra de biopsia del sujeto) (por ejemplo, cualquiera de los cánceres asociados a Trk descritos en el presente documento o conocidos en la técnica). Algunas realizaciones pueden incluir además la administración del tratamiento seleccionado al sujeto identificado o diagnosticado que tiene un cáncer asociado a Trk. Algunas realizaciones pueden incluir además un paso para realizar un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) (por ejemplo, un ensayo que utiliza secuenciación de próxima generación, inmunohistoquímica o análisis FISH de ruptura) (por ejemplo, utilizando un organismo regulador aprobado, por ejemplo, kit aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, e identificar o diagnosticar a un sujeto que se determinó que tiene desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, como si tuviera un cáncer asociado a Trk.

También se proporcionan métodos para seleccionar un tratamiento para un sujeto que incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263), en el que los métodos incluyen un paso para realizar un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) (por ejemplo, un ensayo que utiliza secuenciación de última generación, inmunohistoquímica o análisis FISH de ruptura) (por ejemplo, utilizando un organismo regulador aprobado, por ejemplo, kit aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, e identificar o diagnosticar a un sujeto determinado para tener desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, como si tuviera un cáncer asociado a Trk, y seleccionar un tratamiento terapéutico que incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) para el sujeto identificado o diagnosticado con un cáncer asociado a Trk. Algunas realizaciones incluyen además la administración del tratamiento seleccionado al sujeto identificado o diagnosticado que tiene un cáncer asociado con Trk.

También se proporcionan métodos para seleccionar un sujeto para el tratamiento, incluida la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) que incluyen la selección, identificación o diagnóstico de un sujeto que tiene un cáncer asociado con Trk, y la selección del sujeto para el tratamiento, incluida la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263). En algunas realizaciones, la identificación o el diagnóstico de un sujeto que tiene un cáncer asociado a Trk puede incluir un paso para realizar un ensayo (por ejemplo, un ensayo *in vitro*) (por ejemplo, un ensayo que utiliza secuenciación de próxima generación, inmunohistoquímica o análisis FISH de ruptura). (por ejemplo, utilizando un kit aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, aprobado por la FDA) en una muestra obtenida del sujeto para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de lo mismo, e identificar o diagnosticar a un sujeto que se ha determinado que tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, como si tuviera un

cáncer asociado a Trk. En algunas realizaciones, la selección de un tratamiento puede usarse como parte de un estudio clínico que incluye la administración de varios tratamientos de un cáncer asociado con Alk.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos o usos descritos en el presente documento, se usa un ensayo para determinar si el sujeto tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, usando una muestra (por ejemplo una muestra biológica o una muestra de biopsia (por ejemplo, una muestra de biopsia embebida en parafina) de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer asociado a Trk, un sujeto que tiene uno o más síntomas de un cáncer asociado a Trk y/o un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar un cáncer asociado a Trk) puede incluir, por ejemplo, secuenciación de próxima generación, inmunohistoquímica, microscopía de fluorescencia, análisis FISH de ruptura, transferencia Southern, transferencia Western, análisis FACS, transferencia Northern y análisis basado en PCR. amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Como es bien conocido en la técnica, los ensayos se realizan normalmente, por ejemplo, con al menos una sonda de ácido nucleico marcada o al menos un anticuerpo marcado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ensayos pueden utilizar otros métodos de detección conocidos en la técnica para detectar la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o los niveles de los mismos (véanse, por ejemplo, las referencias citadas en este documento).

En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) es útil para tratar el dolor crónico y agudo, incluido el dolor asociado con el cáncer, la cirugía y la fractura ósea. La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) puede ser útil en el tratamiento de múltiples tipos de dolor, incluido el dolor inflamatorio, el dolor neuropático y el dolor asociado con el cáncer, la cirugía y las fracturas óseas. La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) también son útiles para tratar cánceres que incluyen neuroblastoma, cáncer de ovario, pancreático y colorrectal. La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) también es útil para tratar la inflamación y ciertas enfermedades infecciosas. Además, la forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) también se puede usar para tratar la cistitis intersticial (IC), el síndrome de vejiga dolorosa (PBS), la incontinencia urinaria, el asma, la anorexia, la dermatitis atópica y la psoriasis. La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) también se puede usar para tratar la desmielinización y la desmielinización al promover la mielinización, la supervivencia neuronal y la diferenciación de oligodendrocitos mediante el bloqueo de la interacción Sp35-TrkA. La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) puede ser útil en el tratamiento de múltiples tipos de dolor, incluido el dolor inflamatorio, el dolor neuropático, el dolor quirúrgico y el dolor asociado con el cáncer. La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) puede ser útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con los huesos (tal como las que implican la reabsorción ósea). Los ejemplos de enfermedades relacionadas con los huesos incluyen enfermedad ósea metastásica, pérdida ósea inducida por tratamiento, osteoporosis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Paget y enfermedad periodontal. La osteoporosis puede atribuirse a (1) la menopausia en las mujeres, (2) el envejecimiento en los hombres o las mujeres, (3) el crecimiento óseo subóptimo durante la niñez y la adolescencia que resultó en la imposibilidad de alcanzar la masa ósea máxima y/o (4) la pérdida ósea secundario a otras enfermedades, trastornos alimentarios, medicamentos y/o tratamientos médicos. Otras enfermedades osteolíticas que pueden tratarse según los métodos proporcionados en el presente documento están más localizadas. Un ejemplo particular es la osteólisis inducida por tumores metastásicos. En esta condición, los cánceres óseos o las metástasis óseas inducen osteólisis localizada que provoca dolor, debilidad ósea y fracturas. Tal osteólisis localizada también permite que los tumores crezcan más al crear más espacio para ellos en el hueso y liberar factores de crecimiento de la matriz ósea. Los cánceres que actualmente se sabe que causan osteólisis inducida por tumores incluyen neoplasias malignas hematológicas (por ejemplo, mieloma y linfoma) y tumores sólidos (por ejemplo, de mama, próstata, pulmón, riñón y tiroides), todos los cuales contempla el tratamiento en la presente divulgación. Como se usa aquí, el término tratamiento incluye la profilaxis así como el tratamiento de una condición existente.

Por consiguiente, también se proporciona en el presente documento un método para tratar enfermedades o condiciones médicas en un sujeto que lo necesite, en el que dicha enfermedad o condición se puede tratar con un inhibidor de TrkA y/o TrkB (por ejemplo, un cáncer asociado con Trk), que comprende administrar a dicha forma cristalina en cuestión (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263 en una cantidad eficaz para tratar o prevenir dicho trastorno. En una realización particular, se proporciona aquí un método para tratar el dolor, el cáncer, la inflamación, la enfermedad neurodegenerativa o la infección por Trypanosoma cruzi en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263). En otra realización, en el presente documento se proporciona un método para tratar la enfermedad osteolítica en un mamífero, que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesita una cantidad

terapéuticamente eficaz de forma cristalina (I-HS) o un compuesto de fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263).

La forma cristalina (I-HS) o un compuesto de Fórmula I o una de sus sales, como una sal de sulfato de hidrógeno (por ejemplo, véase el Ejemplo 14A de la Patente U.S. No. 8,513,263) se puede usar en combinación con uno o más medicamentos adicionales que funcionan por el mismo mecanismo de acción o por uno diferente. Dicho tratamiento conjunto puede lograrse mediante la administración simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento. Los ejemplos incluyen compuestos antiinflamatorios, esteroides (por ejemplo, dexametasona, cortisona y fluticasona), analgésicos como los NSAID (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, indometacina y ketoprofeno) y opioides (tal como la morfina) y agentes quimioterapéuticos.

- 5 En el campo de la oncología médica, es una práctica normal utilizar una combinación de diferentes formas de tratamiento para tratar a cada paciente con cáncer. En oncología médica, el(los) otro(s) componente(s) de dicho tratamiento conjunto además de las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia, inhibidores de la transducción de señales y/o anticuerpos monoclonales.
- 10 En consecuencia, la forma cristalina (I-HS) puede administrarse en combinación con uno o más agentes seleccionados de inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, ADN o ARN antisentido, antibióticos intercalados, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de la transducción de señales, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de enzimas, moduladores de receptores de retinoides, inhibidores de proteasomas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, inhibidores de la angiogénesis, agentes citostáticos antiandrógenos, anticuerpos dirigidos, inhibidores de la HMG-CoA reductasa e inhibidores de la prenil-proteína transferasa.

15 Cuando el compuesto divulgado en el presente documento tiene al menos un centro quiral, los compuestos pueden existir en consecuencia como enantiómeros. Cuando los compuestos poseen dos centros quirales, los compuestos pueden existir adicionalmente como diastereoisómeros. Es decir, el compuesto de Fórmula I, además de tener la configuración deseada designada por la nomenclatura " sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida" (en lo sucesivo, el isómero (S,R)), también puede estar presente en cantidades menores como el isómero sulfato de hidrógeno de (R)-N- (5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (en lo sucesivo denominado isómero (R,R)) y/o también puede estar presente en cantidades menores como sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((S)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (en lo sucesivo denominado isómero (S,S)), y/o puede estar presente en cantidades menores como el isómero sulfato de hidrógeno de (R)-N-(5-((S)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida " (en lo sucesivo denominado isómero (R,S)). Debe entenderse que todos estos isómeros y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la presente invención. Preferiblemente, cuando el compuesto está presente como el isómero (S,R), el isómero (S,R) está presente en un exceso mayor o igual a aproximadamente el 80%, más preferiblemente en un exceso mayor o igual a aproximadamente 90%, más preferiblemente aún en un exceso mayor o igual a aproximadamente el 95%, más preferiblemente aún en un exceso mayor o igual a aproximadamente el 98%, más preferiblemente en un exceso mayor o igual a aproximadamente el 99%.

20 Se apreciará que la forma cristalina (I-HS) contiene dos centros de asimetría y, por lo tanto, puede prepararse y aislarse en una mezcla de isómeros, como una mezcla racémica o diastereomérica, o en una forma enantioméricamente pura. 40 Cuando la estereoquímica se especifica mediante una cuña sólida o una línea discontinua que representa una configuración particular, entonces ese estereoisómero se especifica y define así.

25 Como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, el término "forma aislada" significará que el compuesto está presente en una forma que está separada de cualquier mezcla sólida con otro(s) compuesto(s), sistema disolvente o entorno biológico. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) está presente como una forma aislada. 30 Como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, el término "forma sustancialmente pura" significará que el porcentaje en moles de impurezas en el compuesto aislado o en la forma cristalina es inferior al 5 por ciento en moles, preferentemente inferior al 2 por ciento en moles, más preferentemente, menos de aproximadamente 0.5 por ciento en moles, lo más preferiblemente, menos de aproximadamente 0.1 por ciento en moles. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) está presente como una forma sustancialmente pura.

35 45 Como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, el término "sustancialmente libre de otras formas amorfas, polimorfas o cristalinas" cuando se usa para describir la forma cristalina (I-HS) significará que el porcentaje molar de otra forma amorfica, polimorfa o cristalina (s) de la base aislada de forma cristalina (I-HS) es menos de un 5 por ciento en moles, preferiblemente menos de un 2 por ciento en moles, más preferiblemente menos de un 0.5 por ciento en moles, lo más preferiblemente menos de un 0.1 por ciento en moles. En algunas realizaciones, la forma cristalina (I-HS) está presente como una forma sustancialmente libre de otras formas amorfas, polimorfas o cristalinas.

50 Los términos "polimorfo" y "forma polimórfica" se refieren a diferentes formas cristalinas de un único compuesto. Es decir, los polimorfos son sólidos distintos que comparten la misma fórmula molecular, pero cada polimorfo puede tener distintas propiedades físicas de estado sólido. Por lo tanto, un solo compuesto puede dar lugar a una variedad de

formas polimórficas donde cada forma tiene propiedades físicas de estado sólido diferentes y distintas, como diferentes perfiles de solubilidad, velocidades de disolución, temperaturas de punto de fusión, fluidez y/o diferentes picos de difracción de rayos X. Las diferencias en las propiedades físicas pueden afectar parámetros farmacéuticos como la estabilidad de almacenamiento, la compresibilidad y la densidad (que pueden ser importantes en la formulación y fabricación del producto) y la velocidad de disolución (que puede ser un factor importante en la biodisponibilidad). Las técnicas para caracterizar formas polimórficas incluyen, pero no se limitan a, difractometría de rayos X en polvo (XRPD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), difractometría de rayos X monocrystalinos (XRD), espectroscopía vibratoria, por ejemplo, espectroscopía infrarroja (IR) y Raman, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de solución y estado sólido, microscopía óptica, microscopía óptica de etapa caliente, microscopía electrónica de barrido (SEM), cristalográfica electrónica y análisis cuantitativo, análisis de tamaño de partículas (PSA), análisis de área superficial, medidas de solubilidad, medidas de disolución, análisis elemental y análisis de Karl Fischer.

El término "amorfo" significa un sólido en estado sólido que es un estado no cristalino. Los sólidos amorfos son arreglos desordenados de moléculas y, por lo tanto, no poseen una red cristalina distinguible o una celda unitaria y, en consecuencia, no tienen un orden definible de largo alcance. La forma de estado sólido de un sólido puede determinarse mediante microscopía de luz polarizada, difracción de rayos X en polvo ("XRPD"), calorimetría diferencial de barrido ("DSC") u otras técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Como se usa en este documento, a menos que se indique lo contrario, los términos "tratar", "tratamiento" y similares, incluirán el manejo y cuidado de un sujeto o paciente (preferiblemente mamífero, más preferiblemente humano) con el propósito de combatir una enfermedad, condición, o trastorno e incluye la administración de un compuesto divulgado para aliviar los síntomas o complicaciones, o reducir la tasa de progresión de la enfermedad, afección o trastorno.

Como se usa en este documento, a menos que se indique lo contrario, el término "prevención" incluirá (a) reducción en la frecuencia de uno o más síntomas; (b) reducción en la severidad de uno o más síntomas; (c) el retraso o la evitación del desarrollo de síntomas adicionales; y/o (d) retraso o evitación del desarrollo del trastorno o condición.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer asociado a Trk" se definirá para incluir cánceres asociados con o que tengan una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, cualquiera de los tipos de desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, descritos en este documento). En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de un cáncer asociado a Trk.

Como se usa en el presente documento, el término "dolor" se definirá para incluir dolor agudo, crónico, inflamatorio y neuropático, incluida la neuropatía diabética. Además, el dolor puede estar mediado centralmente, mediado periféricamente, causado por lesión de tejido estructural, causado por lesión de tejido blando o causado por enfermedad progresiva. Cualquier lesión de tejido estructural mediada centralmente, mediada periféricamente, lesión de tejido blando o dolor relacionado con una enfermedad progresiva puede ser agudo o crónico.

Tal como se usa en este documento, a menos que se indique lo contrario, el dolor debe incluir dolor inflamatorio, dolor de origen central, dolor de origen periférico, dolor visceral, dolor relacionado con estructuras, dolor por cáncer, dolor relacionado con lesiones de tejidos blandos, dolor relacionado con enfermedades progresivas, dolor neuropático, dolor agudo por lesión, dolor agudo por traumatismo, dolor agudo por cirugía, dolor de cabeza, dolor dental, dolor de espalda (preferiblemente dolor lumbar), dolor crónico por afecciones neuropáticas y dolor crónico por afecciones posteriores a un accidente cerebrovascular.

Algunas realizaciones incluyen métodos para el tratamiento del dolor, en los que el dolor es un dolor agudo. Algunas realizaciones incluyen métodos para el tratamiento del dolor, en los que el dolor es un dolor crónico. Algunas realizaciones incluyen métodos para el tratamiento del dolor, en los que el dolor es dolor neuropático, incluida la neuropatía diabética. Algunas realizaciones incluyen métodos para el tratamiento del dolor, en los que el dolor es un dolor inflamatorio.

En algunas realizaciones, el dolor se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor de cabeza, dolor de muelas, quemadura, quemadura solar, mordedura de animal (tal como mordedura de perro, mordedura de gato, mordedura de serpiente, mordedura de araña, picadura de insecto y similares), vejiga neurogénica, hipertrofia prostática benigna, cistitis intersticial, rinitis, dermatitis de contacto/hipersensibilidad, picor, eccema, faringitis, mucositis, enteritis, celulitis, causalgia, neuritis ciática, neuralgia de la articulación mandibular, neuritis periférica, polineuritis, dolor de muñón, dolor de miembro fantasma, ileo posoperatorio, colecistitis, síndrome de dolor posmastectomía, dolor neuropático oral, dolor de Charcot, distrofia simpática refleja, síndrome de Guillain-Barré, neuralgia parestésica, síndrome de boca ardiente, neuralgia posherpética, neuralgia del trigémino, neuropatía periférica, bilateral neuropatía periférica, neuropatía diabética, neuralgia posherpética, neuralgia del trigémino, neuritis óptica, neuritis posfebril, neuritis migratoria, neuritis segmentaria, neuritis de Gombault, neuronitis, neuralgia cervicobraquial, neuralgia craneal, neuralgia geniculada, neuralgia glosofaríngea, neuralgia migrañosa, neuralgia idiopática, neuralgia intercostal, neuralgia mamaria, neuralgia de Morton, neuralgia nasociliar, neuralgia occipital, neuralgia roja, neuralgia de Sluder, neuralgia esplenopalatina, neuralgia supraorbitaria, neuralgia vidiana, enfermedad

inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, trabajo de parto, dolores menstruales, cáncer, dolor de espalda, dolor lumbar y dolor del síndrome del túnel carpiano.

El dolor agudo incluye el dolor causado por una lesión aguda, un traumatismo, una enfermedad o una cirugía (por ejemplo, cirugía a tórax abierto (incluida la cirugía a corazón abierto o de derivación)). El dolor agudo también incluye,

5 pero no se limita a, dolor de cabeza, dolor posoperatorio, dolor por cálculos renales, dolor en la vesícula biliar, dolor por cálculos biliares, dolor obstétrico, dolor reumatológico, dolor dental o dolor causado por lesiones deportivas, síndrome del túnel carpiano, quemaduras, distensiones y esguinces musculoesqueléticos, distensiones musculotendinosas, síndromes de dolor cervicobraquial, dispepsia, úlcera gástrica, úlcera duodenal, dismenorrea o endometriosis.

10 El dolor crónico incluye el dolor causado por una afección inflamatoria, osteoartritis, artritis reumatoide o como secuela de una enfermedad, lesión aguda o traumatismo. El dolor crónico también incluye, y no se limita a, dolor de cabeza, dolor de espalda superior o dolor de espalda inferior (seleccionado del dolor de espalda resultante de enfermedad sistemática, regional o primaria de la columna (seleccionado de radiculopatía)), dolor óseo (seleccionado de dolor óseo debido a osteoartritis, osteoporosis, metástasis óseas o razones desconocidas), dolor pélvico, dolor asociado a 15 lesión de la médula espinal, dolor torácico cardíaco, dolor torácico no cardíaco, dolor central posterior a un accidente cerebrovascular, dolor miofascial, dolor por cáncer, dolor por SIDA, dolor de células falciformes, dolor geriátrico o dolor causado por dolor de cabeza, migraña, neuralgia del trigémino, síndrome de la articulación temporomandibular, síndrome de fibromialgia, osteoartritis, artritis reumatoide, gota, fibrositis o síndromes de salida torácica.

20 El dolor neuropático incluye el dolor resultante de condiciones o trastornos crónicos o debilitantes. Las afecciones o trastornos crónicos o debilitantes que pueden provocar dolor neuropático incluyen, pero no se limitan a, neuropatía periférica diabética dolorosa, neuralgia posherpética, neuralgia del trigémino, dolor posterior a un accidente cerebrovascular, dolor asociado con esclerosis múltiple, dolor asociado con neuropatías como neuropatía y mononeuritis idiopática o posttraumática, dolor neuropático asociado al VIH, dolor neuropático asociado al cáncer, 25 dolor neuropático asociado al túnel carpiano, dolor asociado a lesión de la médula espinal, síndrome de dolor regional complejo, dolor neuropático asociado a fibromialgia, dolor lumbar y dolor cervical, distrofia simpática refleja, síndrome del miembro fantasma y otros síndromes de dolor asociados a condiciones crónicas y debilitantes.

30 Los "trastornos o enfermedades neurodegenerativos agudos" incluyen, pero no se limitan a, varios tipos de trastornos neurodegenerativos agudos asociados con la muerte o el daño neuronal, incluida la insuficiencia cerebrovascular, el trauma cerebral focal, el daño cerebral difuso y la lesión de la médula espinal, es decir, isquemia cerebral o infarto incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica, reperfusión después de isquemia aguda, lesión hipóxico-isquémica perinatal, paro cardíaco, así como hemorragia intracranial de cualquier tipo (incluyendo, pero no limitado a, epidural, subdural, subaracnoidea e intracerebral), y hemorragia intracranial y lesiones intravertebrales (que incluyen, pero no se limitan a, contusión, penetración, cizallamiento, compresión y laceración) y síndrome del niño sacudido por latigazo cervical. En algunas realizaciones, el trastorno neurodegenerativo agudo es el resultado de un accidente cerebrovascular, una lesión isquémica aguda, una lesión en la cabeza o una lesión en la columna.

35 Los "trastornos o enfermedades neurodegenerativos crónicos" incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steele-Richardson), degeneración multisistémica (síndrome de Shy-Drager), afecciones epilépticas crónicas asociadas con neurodegeneración, enfermedades de las neuronas motoras, incluida la esclerosis lateral amiotrófica, 40 ataxias degenerativas, degeneración basal cortical, complejo ALS-Parkinson-Demencia de Guam, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías (incluida la atrofia multisistémica), afasia progresiva primaria, degeneración estriadonigral, enfermedad de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelosa tipo 3 y degeneraciones olivopontocerebelosas, enfermedad de Gilles de la Tourette, parálisis bulbar y pseudobulbar, atrofia muscular espinal y espinobulbar (enfermedad de Kennedy), esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, paraplejía espástica familiar, enfermedad de Werdnig-Hoffmann, Kugelberg-Welander, enfermedad de Tay-Sach, enfermedad de Sandhoff, enfermedad espástica familiar, enfermedad de Wohlfart-Kugelberg-Welander, 45 paraparesia espástica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, disautonomía familiar (síndrome de Riley-Day) y enfermedades prionómicas (incluidas, pero no limitadas a las enfermedades de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, Kuru e insomnio familiar fatal). En algunas realizaciones, el trastorno neurodegenerativo crónico se selecciona de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple o la parálisis cerebral.

50 El término "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento. En algunas realizaciones, el sujeto ha experimentado y/o exhibido al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno a tratar y/o prevenir. En algunas realizaciones, un paciente es un paciente pediátrico (es decir, un paciente menor de 21 años en el momento del diagnóstico o tratamiento). El término "pediátrico" se puede dividir en varias subpoblaciones que incluyen: neonatos (desde el nacimiento hasta los primeros 28 días de vida); infantes (29 días de edad a menos de dos años de edad); niños (de dos años a menos de 12 años); y adolescentes (de 12 años a 21 años de edad (hasta, pero sin incluir, el vigésimo segundo cumpleaños)).

- En algunas realizaciones, se ha identificado o diagnosticado que el sujeto tiene un cáncer con desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, según se determina utilizando un organismo regulador aprobado, por ejemplo, ensayo o kit aprobado por la FDA). En algunas realizaciones, el sujeto tiene un tumor que es positivo para la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, según se determina usando un ensayo o kit aprobado por la agencia reguladora). El sujeto puede ser un sujeto con un tumor positivo para la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, identificado como positivo mediante un organismo regulador aprobado, por ejemplo, ensayo o kit aprobado por la FDA). El sujeto puede ser un sujeto cuyos tumores tengan una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o un nivel de la misma (por ejemplo, kit o ensayo aprobado por la FDA). En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto tiene un cáncer asociado a Trk. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un registro clínico que indica que el sujeto tiene un tumor que tiene una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (y opcionalmente, el registro clínico indica que el sujeto debe tratarse con cualquiera de las composiciones proporcionadas en este documento).
- El término "Trk" o "proteína Trk" incluye cualquiera de las proteínas Trk descritas en el presente documento (por ejemplo, una proteína TrkA, TrkB o TrkC).
- El término "gen NTRK" incluye cualquiera de los genes NTRK descritos en el presente documento (por ejemplo, un gen NTRK1, NTRK2 o NTRK3).
- El término "tipo salvaje" o "tipo salvaje" describe un ácido nucleico (por ejemplo, un gen NTRK o un ARNm de Trk) o una proteína (por ejemplo, una proteína Trk) que se encuentra en un sujeto que no tiene un cáncer asociado a Trk (y opcionalmente tampoco tiene un mayor riesgo de desarrollar un cáncer o una condición asociada a Trk y/o no se sospecha que tenga un cáncer o una condición asociada a Trk) o se encuentra en una célula o tejido de un sujeto que no tiene un cáncer o afección asociado con Trk (y, opcionalmente, tampoco tiene un mayor riesgo de desarrollar un cáncer o afección asociado con Trk y/o no se sospecha que tenga un cáncer o afección asociado con Trk).
- El término "agencia reguladora" es la agencia de un país para la aprobación del uso médico de agentes farmacéuticos con el país. Por ejemplo, un ejemplo no limitante de una agencia reguladora es la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA).
- La expresión "desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos" es una mutación genética (por ejemplo, una translocación del gen NTRK que resulta en la expresión de una proteína de fusión, una delección en un gen NTRK gen que da como resultado la expresión de una proteína Trk que incluye una eliminación de al menos un aminoácido en comparación con la proteína Trk de tipo salvaje, o una mutación en un gen NTRK que da como resultado la expresión de una proteína Trk con uno o más mutaciones puntuales, una versión empalmada alternativa de un ARNm de Trk que da como resultado una proteína Trk que da como resultado la eliminación de al menos un aminoácido en la proteína Trk en comparación con la proteína Trk de tipo salvaje), o una duplicación del gen NTRK que da como resultado en la sobreexpresión de una proteína Trk) o una actividad autocrina resultante de la sobreexpresión de un gen NTRK en una célula, que da como resultado un aumento patógeno en la actividad de un dominio quinasa de una proteína Trk (por ejemplo, un dominio quinasa constitutivamente activo de una proteína Trk) en una célula. Por ejemplo, una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede ser una mutación en un gen NTRK1, NTRK2 o NTRK3 que codifica una proteína Trk que es constitutivamente activa o ha aumentado actividad en comparación con una proteína codificada por un gen NTRK1, NTRK2 o NTRK3 que no incluye la mutación. Por ejemplo, una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede ser el resultado de una translocación génica que da como resultado la expresión de una proteína de fusión que contiene una primera porción de TrkA, TrkB o TrkC que incluye un dominio de quinasa funcional y una segunda porción de una proteína asociada (es decir, que no es TrkA, TrkB o TrkC). Un gen que codifica una proteína de fusión puede incluir, por ejemplo, los siguientes exones de un gen NTRK1 de tipo salvaje: exones 10-19, exones 12-19, exones 12-19, exones 13-19, exones 14-19 o exones 15-19. Un gen que codifica una proteína de fusión puede incluir, por ejemplo, los siguientes exones de un gen NTRK2 de tipo salvaje: exones 12-21, exones 13-21, exones 15-21, exones 16-21 o exones 17-21. Un gen que codifica una proteína de fusión puede incluir, por ejemplo, los siguientes exones de un gen NTRK3 de tipo salvaje: exones 17-22 o exones 16-22. En las Tablas 1, 3 y 4 se describen ejemplos no limitantes de proteínas de fusión que son el resultado de una translocación del gen NTRK.
- Una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede, por ejemplo, incluir una mutación en un gen NTRK1, NTRK2 o NTRK3 que da como resultado un TrkA, TrkB o TrkC que contiene al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) mutaciones puntuales (por ejemplo, una o más de las mutaciones puntuales enumeradas en la Tabla 6). Una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel de los mismos, puede, por ejemplo, incluir una mutación en un gen NTRK2 que da como resultado una proteína TrkB que incluye una mutación puntual de V673M. Una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede, por ejemplo, incluir una mutación en un gen NTRK3 que da como resultado una proteína TrkC que incluye una mutación puntual de H677Y.
- Una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede ser una mutación en un gen NTRK1, NTRK2 o NTRK3 que da como resultado una eliminación de uno o más aminoácidos

contiguos (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 110, al menos 120, al menos 130, al menos 140, al menos 150, al menos 160, al menos 170, al menos 180, al menos 190, al menos 200, al menos 210, al menos 220, al menos 230, al menos 240, al menos 250, al menos 260, al menos 270, al menos 280, al menos 290, al menos 300, al menos 310, al menos 320, al menos 330, al menos 340, al menos 350, al menos 360, al menos 370, al menos 380, al menos 390 o al menos 400 aminoácidos) en la proteína TrkA, TrkB o TrkC (excepto por la eliminación de aminoácidos en el dominio quinasa de TrkA, TrkB o TrkC que resultarían en la inactivación del dominio quinasa). En algunas realizaciones, la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede incluir una delección en un gen NTRK1 que da como resultado una proteína TrkA que carece del sitio de unión a NGF o exón 10, que incluye el sitio de unión de NGF, el último de los cuales está asociado con la leucemia mieloide aguda.

En algunos ejemplos, una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad, o el nivel del mismo, puede incluir una forma alternativa empalmada de un ARNm de Trk, por ejemplo, una variante empalmada de TrkAIII o una forma alternativa empalmada de un ARNm de TrkA que da como resultado la producción de una proteína TrkA que carece de los aminoácidos codificados por el exón 10. En algunos ejemplos, una desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, incluye una amplificación de un gen NTRK (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro copias adicionales del gen NTRK) que puede resultar, por ejemplo, en una expresión autocrina de un gen NTRK en una célula.

El término "cáncer o tumor asociado a Trk" es un cáncer que está asociado con la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos (por ejemplo, un cáncer que está asociado con al menos un ejemplo (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco ejemplos) de desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o expresión o actividad, o nivel de los mismos, descritos en este documento).

El término "mamífero", como se usa en este documento, se refiere a un animal de sangre caliente que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad descrita en este documento e incluye, pero no se limita a cobayos, perros, gatos, ratas, ratones, hámsters, y primates, incluidos los humanos.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano que está buscando un investigador, veterinario, médico u otro internista, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. En particular, una cantidad terapéuticamente eficaz, cuando se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento, es suficiente para (i) tratar o prevenir una enfermedad, afección o trastorno en particular que puede tratarse con un inhibidor de TrkA y/o TrkB, (ii) atenuar, mejorar o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad, condición o trastorno en particular, o (iii) prevenir o retrasar la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, condición o trastorno en particular descritos en este documento. La cantidad de forma cristalina (I-HS) que corresponderá a tal cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo de factores tales como el estado de la enfermedad y su gravedad, la identidad (por ejemplo, peso) del mamífero que necesita tratamiento, pero no obstante puede ser determinado rutinariamente por un experto en la técnica.

Como se usa aquí, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas aquí no están calificadas con el término "aproximadamente". Se entiende que ya sea que el término "sobre" se use explícitamente o no, cada cantidad dada en este documento se refiere al valor real dado, y también se refiere a la aproximación a dicho valor dado que razonablemente se inferiría con base en la experiencia normal en la técnica, incluidas las aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor dado.

En algunas realizaciones, el término "aproximadamente" se usa aquí para significar aproximadamente, en la región de, apenas o alrededor. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un rango numérico, modifica ese rango al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se usa aquí para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una variación del 10%.

El término "aproximadamente" que precede a una o más posiciones de pico en un patrón de difracción de rayos X en polvo significa que todos los picos del grupo al que precede se informan en términos de posiciones angulares (dos theta) con una variabilidad permisible de $\pm 0.3^\circ$. La variabilidad de $\pm 0.3^\circ$ está destinada a utilizarse al comparar dos patrones de difracción de rayos X en polvo. En la práctica, si al pico de un patrón de difracción de un patrón se le asigna un rango de posiciones angulares (dos theta) que es la posición del pico medido $\pm 0.3^\circ$ y si esos rangos de posiciones de pico se superponen, se considera que los dos picos tienen la misma posición angular. Por ejemplo, si se determina que un pico de un patrón tiene una posición de 11.0° , para propósitos de comparación, la variabilidad permisible permite que se asigne al pico una posición en el rango de 10.7° - 11.3° .

El término "aproximadamente" que precede a un valor de DSC, TGA, TG o DTA, que se expresan en grados Celsius, tienen una variabilidad permisible de ± 5 °C.

Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas en este documento se mencionan como un rango de aproximadamente la cantidad X a aproximadamente la cantidad Y. Se entiende que cuando se menciona un rango, el rango no se limita a los límites superior e inferior indicados, sino que incluye el rango completo desde aproximadamente la cantidad X hasta aproximadamente la cantidad Y, o cualquier rango en el mismo.

Además, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen forma cristalina (I-HS) con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen la forma cristalina (I-HS) como ingrediente activo se pueden preparar mezclando íntimamente la forma cristalina (I-HS) con un vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas convencionales de preparación de compuestos farmacéuticos. El vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la ruta de administración deseada (por ejemplo, oral, parenteral). Así, para preparaciones orales líquidas tales como suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos y aditivos adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, estabilizantes, agentes colorantes y similares; para preparaciones orales sólidas, tales como polvos, cápsulas y comprimidos, los vehículos y aditivos adecuados incluyen almidones, azúcares, diluyentes, agentes granuladores, lubricantes, aglutinantes, agentes desgregantes y similares. Las preparaciones orales sólidas también se pueden recubrir con sustancias tales como azúcares o tener un recubrimiento entérico para modular el sitio principal de absorción. Para la administración parenteral, el vehículo generalmente consistirá en agua estéril y se pueden agregar otros ingredientes para aumentar la solubilidad o la conservación. También se pueden preparar suspensiones o soluciones inyectables utilizando vehículos acuosos junto con los aditivos apropiados.

La forma cristalina (I-HS) puede administrarse por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, por vía rectal u oral), la nariz, los pulmones, la musculatura o la vasculatura, o por vía transdérmica o dérmica. La forma cristalina (I-HS) puede administrarse en cualquier forma administrativa conveniente, por ejemplo tabletas, polvos, cápsulas, soluciones, dispersiones, suspensiones, jarabes, aerosoles, supositorios, geles, emulsiones, parches, etc. Tales composiciones pueden contener componentes convencionales en preparaciones farmacéuticas, por ejemplo diluyentes, vehículos, modificadores de pH, edulcorantes, agentes de carga y otros agentes activos. Si se desea la administración parenteral, las composiciones serán estériles y en forma de solución o suspensión adecuadas para inyección o infusión. Tales composiciones forman un aspecto adicional de la invención.

También se proporcionan en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina (I-HS). Para preparar las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, la forma cristalina (I-HS) como ingrediente activo se mezcla íntimamente con un vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas convencionales de composición farmacéutica, cuyo vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, oral o parenteral tal como intramuscular. Al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales. Por lo tanto, para preparaciones orales líquidas, como por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos y aditivos adecuados incluyen agua, glicoles, gliceroles, aceites, ciclodextrinas, alcoholes, por ejemplo, etanol, agentes aromatizantes, conservantes, colorantes y similares; para preparaciones orales sólidas tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas, caplets, cápsulas de gel y comprimidos, los vehículos y aditivos adecuados incluyen almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas como acacia, tragacanto u oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro y similares. Los desgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Debido a su facilidad de administración, las tabletas y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas se pueden recubrir con azúcar o con recubrimiento entérico mediante técnicas estándar. Para parenterales, el vehículo normalmente comprenderá agua esterilizada, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, para fines tales como ayudar a la solubilidad o para la conservación. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Las composiciones farmacéuticas del presente documento contendrán, por unidad de dosificación, por ejemplo, tableta, cápsula, polvo, inyección, cucharadita y similares, una cantidad del ingrediente activo necesaria para administrar una dosis eficaz como se describe anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas del presente documento contendrán, por unidad de dosificación unitaria, por ejemplo, tableta, cápsula, suspensión, solución, bolsita para reconstitución, polvo, inyección, IV, supositorio, película sublingual/bucal, cucharadita y similares, de aproximadamente 0,1-1000 mg o cualquier intervalo de los mismos, y puede administrarse en una dosis de aproximadamente 0,01-300 mg/kg/día, o cualquier intervalo de los mismos, preferiblemente de aproximadamente 0,5-50 mg/kg/día, o cualquier intervalo de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento contienen, por unidad de dosificación unitaria, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 500 mg de un compuesto proporcionado en el presente documento (por ejemplo, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 25 mg a

aproximadamente 200 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 75 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 250 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 300 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 100 a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 50 a aproximadamente 150 mg). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento contienen, por unidad de dosificación unitaria, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg o aproximadamente 500 mg de un compuesto proporcionado en este documento. Sin embargo, las dosis pueden variar dependiendo de los requisitos de los pacientes, la gravedad de la afección que se está tratando y el compuesto que se está empleando. En algunas realizaciones, las dosificaciones se administran una vez al día (QD) o dos veces al día (BID).

Preferiblemente, estas composiciones están en formas de dosificación unitaria tales como tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, aerosoles medidos o aspersiones líquidas, gotas, ampollas, dispositivos de autoinyección o supositorios; para administración oral parenteral, intranasal, sublingual o rectal, o para administración por inhalación o insuflación. Alternativamente, la composición puede presentarse en una forma adecuada para la administración una vez a la semana o una vez al mes; por ejemplo, una sal insoluble del compuesto activo, tal como la sal decanoato, puede adaptarse para proporcionar una preparación de depósito para inyección intramuscular. Para preparar composiciones sólidas como tabletas, la forma cristalina (I-HS) se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo ingredientes para formación de tabletas convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de forma cristalina (I-HS). Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo se dispersa uniformemente por toda la composición para que la composición se pueda subdividir fácilmente en formas de dosificación igualmente eficaces tales como tabletas, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen de 0.1 a aproximadamente 1000 mg, o cualquier cantidad o rango de la misma, del ingrediente activo proporcionado en este documento. Las tabletas o píldoras de la novedosa composición se pueden recubrir o combinar de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender un dosificador interior y un componente de dosificación exterior, estando este último en forma de envoltorio sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en su liberación. Se puede usar una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales varios ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las novedosas composiciones proporcionadas en el presente documento para su administración por vía oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, ciclodextrinas, jarabes aromatizados adecuadamente, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones saborizadas con aceites comestibles como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Los agentes dispersantes o de suspensión adecuados para suspensiones acuosas incluyen gomas sintéticas y naturales tales como tragacanto, acacia, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina. Para la administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Las preparaciones isotónicas que generalmente contienen conservantes adecuados se emplean cuando se desea la administración intravenosa.

La forma cristalina (I-HS) se puede administrar en forma intranasal mediante el uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o mediante parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Para administrarse en forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de la dosis será, por supuesto, continua en lugar de intermitente a lo largo del régimen de dosificación.

Para preparar las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, la forma cristalina (I-HS) como ingrediente activo se mezcla íntimamente con un vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas convencionales de composición farmacéutica, cuyo vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración (por ejemplo, oral o parenteral). Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica. Las descripciones de algunos de estos vehículos farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en The Handbook of Pharmaceutical Excipients, publicado por la American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society de Gran Bretañaen.

Los métodos para formular composiciones farmacéuticas se han descrito en numerosas publicaciones tales como Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Second Edition, Revised and Expanded, volúmenes 1 a 3, editada por Lieberman et al; Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Volúmenes 1-2, editado por Aves et al; y Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Volúmenes 1-2, editado por Lieberman et al; publicado por Marcel Dekker, Inc.

Los compuestos proporcionados en el presente documento pueden administrarse en cualquiera de las composiciones anteriores y de acuerdo con los regímenes de dosificación establecidos en la técnica siempre que se requiera el tratamiento de cáncer, dolor, inflamación, enfermedad neurodegenerativa o infección por Trypanosoma cruzi.

5 La dosificación diaria de la forma cristalina (I-HS) se puede variar en un amplio rango de 1.0 a 10.000 mg por ser humano adulto por día, o más, o cualquier rango dentro de este. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferentemente en forma de tabletas que contienen 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 150, 200, 250 y 500 miligramos de la principio activo para el ajuste sintomático de la posología al paciente a tratar. Una cantidad eficaz del fármaco normalmente se suministra a un nivel de dosificación de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier rango dentro de este. Preferiblemente, el rango es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier rango dentro del mismo. Más preferiblemente, de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier intervalo de los mismos. Más preferiblemente, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier intervalo entre ellos. En un ejemplo, el rango puede ser de aproximadamente 0.1 a

10 aproximadamente 50.0 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier cantidad o rango dentro del mismo. En otro ejemplo, el rango puede ser de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 15.0 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier rango dentro del mismo. En aún otro ejemplo, el rango puede ser de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 7.5 mg/kg de peso corporal por día, o cualquier cantidad dentro del rango. La forma cristalina (I-HS) se puede administrar en un régimen de 1 a 4 veces al día o en una sola dosis diaria.

15 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas a administrar, y variarán con el modo de administración, la potencia de la preparación, el modo de administración y el avance de la enfermedad. Además, los factores asociados con el paciente particular que se está tratando, incluyendo la edad del paciente, el peso, la dieta y el momento de la administración, darán como resultado la necesidad de ajustar las dosificaciones.

20 Un experto en la técnica reconocerá que, tanto los ensayos *in vivo* como los *in vitro* usando modelos celulares y/o animales adecuados, conocidos y generalmente aceptados, son predictivos de la capacidad de un compuesto de prueba para tratar o prevenir un trastorno dado.

25 Un experto en la técnica reconocerá además que los ensayos clínicos en humanos, incluidos los ensayos de eficacia y rango de dosis por primera vez en humanos, en pacientes sanos y/o aquellos que padecen un trastorno determinado, pueden completarse de acuerdo con métodos bien conocidos en el campo clínico y artes médicas.

Los acrónimos que se encuentran en la especificación tienen los siguientes significados:

ATP	trifosfato de adenosina
DI	desionizado
EtOH	etanol
GC	cromatografía de gases
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MTBE	metil tert-butil éter
PDA	matriz de fotodiódos
RRT	tiempo de retención relativo
RT	temperatura ambiente
THF	tetrahidrofurano
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina

30 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y se establecen para ayudar en la comprensión de la invención, y no pretenden ni deben interpretarse como limitantes de ninguna manera de la invención expuesta en las reivindicaciones que siguen a continuación.

35 En los ejemplos que se describen a continuación, a menos que se indique lo contrario, todas las temperaturas se expresan en grados Celsius. Los reactivos se adquirieron de proveedores comerciales tales como Sigma-Aldrich Chemical Company, EMD, JT Baker o Pharco-Aaper, y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. El tetrahidrofurano (THF), el heptano y otros disolventes orgánicos se adquirieron de proveedores comerciales, tales como Sigma-Aldrich Chemical Company, ACROS, Alfa-Aesar, Lancaster, TCI o Maybridge, y se usaron tal como se recibieron.

40 Un experto en la técnica reconocerá que, cuando no se especifique lo contrario, la(s) etapa(s) de reacción se realizan bajo condiciones adecuadas, de acuerdo con métodos conocidos, para proporcionar el producto deseado. Un experto

- en la técnica también reconocerá que cuando una etapa de reacción como se describe aquí puede llevarse a cabo en una variedad de disolventes o sistemas de disolventes, dicha etapa de reacción también puede llevarse a cabo en una mezcla de los disolventes o sistemas de disolventes adecuados. Un experto en la técnica reconocerá que, en la especificación y las reivindicaciones que se presentan en este documento, en las que se menciona un reactivo o una clase/tipo de reactivo (por ejemplo, base, disolvente, etc.) en más de un paso de un proceso, los reactivos individuales son seleccionados independientemente para cada paso de reacción y pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, cuando dos pasos de un proceso mencionan una base orgánica o inorgánica como reactivo, la base orgánica o inorgánica seleccionada para el primer paso puede ser igual o diferente a la base orgánica o inorgánica del segundo paso.
- Las reacciones que se exponen a continuación se realizaron generalmente bajo una presión positiva de nitrógeno (a menos que se indique lo contrario) en disolventes de "grado ACS", y los matraces de reacción normalmente se equiparon con septas de goma para la introducción de sustratos y reactivos a través de una jeringa o un embudo de adición.
- Se usaron dos sistemas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase reversa para la monitorización y análisis en proceso, usando acetonitrilo y agua/ácido trifluoroacético como fases móviles. Un sistema empleó una columna Agilent Zorbax Extend C18 a 264 nm, mientras que el otro sistema (en adelante, "HPLC TRK1PM1") incluyó una columna Waters Xbridge Phenyl a 268 nm. A menos que se especifique lo contrario, se utilizó el sistema anterior. La sílice para ambos sistemas se agitó en un matraz con el compuesto y luego se filtró a través de una tela de polipropileno antes de ser analizada.
- Forma de base libre amora de compuesto de Fórmula I: Aproximadamente 1 gramo de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida se disuelve en una cantidad mínima de agua y se enfriá a una temperatura de aproximadamente -26° Celsius seguido de secado en el liofilizador durante 24 horas. Se pesaron aproximadamente 20 mg del material amoro obtenido del liofilizador en un vial, al que se añadieron alícuotas de 5 volúmenes de un sistema disolvente apropiado. Se comprobó la disolución de la mezcla y si no era evidente la disolución, la mezcla se calentó a aproximadamente 40° Celsius y se comprobó de nuevo. Este procedimiento se continuó hasta que se observó disolución o hasta que se hubieron añadido 100 volúmenes de disolvente. El patrón de XRPD del material amoro obtenido del experimento de liofilización se muestra en la Figura 7.
- La sal de sulfato de hidrógeno amoro de compuesto de Fórmula I se preparó como se describe en el Ejemplo 14A en WO 2010/048314 (véase el Ejemplo 3). Los patrones de XRPD de los dos lotes diferentes de material amoro preparados por este método se muestran en la Figura 28.
- También se proporciona aquí un proceso para la preparación de la forma cristalina (I-HS). En algunas realizaciones, el proceso comprende los pasos que se muestran en el Esquema 1.
- En algunas realizaciones, aquí se proporciona un proceso para la preparación de la forma cristalina (I-HS), que comprende:
- (a) añadir ácido sulfúrico concentrado a una solución de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida en EtOH para formar la sal de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida;
- (b) agregar heptano a la solución en el Paso (a) para formar una suspensión;
- (c) filtrar la suspensión para aislar sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida;
- (d) mezclar dicho sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida con una solución 5:95 p/p de agua/2-butanona;
- (e) calentar la mezcla del paso (d) a aproximadamente 65-70 °C con agitación hasta que el porcentaje en peso de etanol sea de aproximadamente 0.5 % para formar una suspensión de la forma cristalina de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida; y
- (f) aislar la forma cristalina de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida por filtración.
- En algunas realizaciones, el método anterior comprende además: (b1) sembrar la solución del paso (a) con sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida a temperatura ambiente y dejar que la solución se agite hasta que se forme una suspensión.
- En algunas realizaciones, aquí se proporciona un proceso para la preparación de la forma cristalina (I-HS), que comprende:
- (a) hacer reaccionar (R)-2-hidroxisuccinato de 5-cloro-3-nitropirazolo[1,5-a]pirimidina con (R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina en presencia de una base para formar (R)-5-(2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-3-nitropirazol[1,5-a]pirimidina;

(b) tratar dicho (*R*)-5-(2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-3-nitropirazol[1,5-a]pirimidina con Zn y ácido clorhídrico para formar (*R*)-5-(2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-amina;

(c) tratar dicho (*R*)-5-(2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-amina con una base y cloroformiato de fenilo para formar (*R*)-(5-(2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)carbamato de fenilo;

5 (d) hacer reaccionar dicho (*R*)-(5-(2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)carbamato de fenilo con (*S*)-pirrolidin-3-ol para formar (*S*)-N-(5-((*R*)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida;

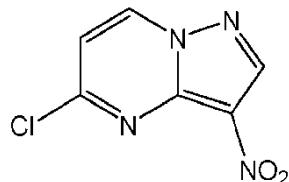
10 (e) añadir ácido sulfúrico a dicho (*S*)-N-(5-((*R*)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida para formar sulfato de hidrógeno de (*S*)-N-(5-((*R*)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida; y

(f) aislar la forma cristalina de sulfato de hidrógeno de (*S*)-N-(5-((*R*)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida.

En algunas realizaciones del paso (a) anterior, la base es una base de amina, tal como trietilamina.

15 En algunas realizaciones del paso (c) anterior, la base es una base de metal alcalino, como un carbonato de metal alcalino, como carbonato de potasio.

Preparación A



Preparación de 5-cloro-3-nitropirazolo[1,5-a]pirimidina

20 Paso A - Preparación de pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-olato de sodio: Una solución de 1H-pirazol-5-amina y 1,3-dimetilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (1.05 equiv.) se cargó en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador mecánico, una olla de vapor, un condensador de refluxo, una sonda de temperatura J-Kem y un adaptador de N₂ para control de presión positiva de N₂. Bajo agitación mecánica, los sólidos se suspendieron con 4 vol. (4 ml/g) de EtOH absoluto en atmósfera de nitrógeno, luego se carga con 2.1 equivalentes de NaOEt (solución al 21 % en peso en EtOH) y se sigue con un enjuague de línea con 1 vol. (1 mL/g) de EtOH absoluto. La suspensión se calentó a aproximadamente 75° Celsius y se agitó a refluxo suave hasta que HPLC TRK1PM1 observó menos del 1.5 % del área de 1H-pirazol-5-amina para seguir la progresión de la reacción utilizando 20 µL de suspensión diluida en 4 ml de agua desionizada e inyección de 5 µL a 220 nm.

25 Despues de 1 hora adicional, la mezcla se cargó con 2.5 vol. (2.5 ml/g) de heptano y luego se calentó a refluxo a 70° Celsius durante 1 hora. A continuación, la suspensión se enfrió a temperatura ambiente durante la noche. El sólido se recogió por filtración en un embudo de mesa y un filtro de tela de polipropileno. El reactor se enjuagó y se cargó encima de la torta del filtro con 4 vol. (4 mL/g) de heptano con la torta desmoldada y trasladándose los sólidos a charolas de secado taradas y secadas en horno a 45° Celsius bajo alto vacío hasta que su peso sea constante. Se obtuvo pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-olato de sodio sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del 93-96 % (corregido) y un área superior al 99.5 % observada por HPLC (dilución de 1 mg/ml en agua desionizada, TRK1PM1 a 220nm).

30 Paso B - Preparación de 3-nitropirazolo[1,5-a]pirimidin-5(4H)-ona: Se cargó un matraz de fondo redondo tarado con pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-olato de sodio que se disolvió a 40-45° Celsius en 3.0 vol. (3.0 mL/g) de agua desionizada, y luego se concentró a alto vacío a 65° Celsius en un baño de agua en un evaporador rotatorio hasta que se observaron 2.4 × peso del material de partida (1.4 vol/1.4 mL/g contenido de agua desionizada). Se realizó cromatografía de gases (GC) para EtOH residual (30 µL de solución disuelta en ~ 1 mL de MeOH) que mostró menos de 100 ppm con trazas de vapores de nitrato de etilo que se observaron a continuación luego de la adición posterior de HNO₃. En algunos casos, la solución original se cargó con 1.5 vol. adicionales. (1.5 mL/g) de agua DI, luego se concentró bajo alto vacío a 65° Celsius en un baño de agua en un evaporador rotatorio hasta que se observaron 2.4 × peso del material de partida (1.4 vol/1.4 mL/g contenido de agua DI). Se realizó una cromatografía de gases para EtOH residual (30 µL de solución disuelta en aproximadamente 1 mL de MeOH) que mostró <<100 ppm de EtOH residual sin observar ningún humo de nitrato de etilo debajo después de la adición posterior de HNO₃.

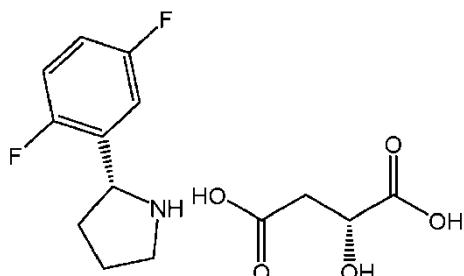
35 Un recipiente de fondo redondo equipado con un agitador mecánico, una olla de vapor, un condensador de refluxo, una sonda de temperatura J-Kem y un adaptador de N₂ para control de presión positiva de N₂ se cargó con 3 vol. (3 ml/g, 10 equivalentes) de >90 % en peso de HNO₃ y se enfrió a aproximadamente 10° Celsius bajo una atmósfera de nitrógeno usando un baño de enfriamiento externo de agua helada bajo una atmósfera de nitrógeno. Usando un embudo de adición de compensación de presión, la solución de HNO₃ se cargó con 1.75-1.95 volúmenes de una

solución de agua desionizada de pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-olato de sodio (1.16-1.4 ml de agua DI/g de pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-olato de sodio) a una tasa para mantener una temperatura interna de 35-40° Celsius bajo enfriamiento. Se observaron dos azeótropos sin vapores de nitrato de etilo. El matraz de azeótropo, la línea de transferencia (si corresponde) y el embudo de adición se enjuagaron con 2 × 0.1 vol. (2 × 0.1 ml/g) de agua desionizada añadida a la mezcla de reacción. Una vez que se completó la adición, la temperatura se aumentó gradualmente a aproximadamente 45-50° Celsius durante aproximadamente 3 horas con HPLC que mostró una conversión de > 99.5% del área de pirazolo[1,5-a]pirimidin-5-olato de sodio en 3-nitropirazol[1,5-a]pirimidin-5(4H)-ona.

Paso C - Preparación de 5-cloro-3-nitropirazol[1,5-a]pirimidina: Se cargó 3-nitropirazol[1,5-a]pirimidin-5(4H)-ona en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador mecánico, una manta calentadora, un condensador de reflujo, una sonda de temperatura J-Kem y un adaptador de N₂ para control de presión positiva de N₂. Bajo agitación mecánica, los sólidos se suspendieron con 8 volúmenes (8 mL/g) de CH₃CN, y luego se cargó con 2,6-lutitina (1.05 equiv) y luego se calentó la suspensión a aproximadamente 50° Celsius. Usando un embudo de adición de compensación de presión, la mezcla se cargó gota a gota con 0.33 equivalentes de POCl₃. Esta carga produjo una suspensión espesa de color beige de un trímero que se homogeneizó mientras se agitaba hasta que se observó una masa semimóvil. Se cargaron 1.67 equivalentes adicionales de POCl₃ a la mezcla mientras se dejaba que la temperatura se estabilizara, seguido de calentamiento de la mezcla de reacción a reflujo suave (78° Celsius). Se observó algo de hinchamiento al calentar la mezcla que luego disminuyó a medida que la suspensión espesa se diluía.

La mezcla de reacción se dejó a reflujo hasta su completa disolución en una solución oscura y hasta que el HPLC (20 µL diluidos en 5 mL de CH₃CN, HPLC TRK1PM1, inyección de 5 µL, 268 nm) confirmó que no había más trímero (RRT 0.92) con menos del 0.5 % del área de 3-nitropirazol[1,5-a]pirimidin-5(4H)-ona (RRT 0.79) que se observa mediante la eliminación manual de cualquier pico de interferencia y de elución temprana relacionado con la lutidina del área de integración. En una escala de 1.9 kg, se observó 0% de área del trímero, 0.25% de área de 3-nitropirazol[1,5-a]pirimidin-5(4H)-ona y 99.5% de área de 5-cloro-3-nitropirazol[1,5-a]pirimidina después de 19 horas de reflujo suave usando HPLC TRK1PM1 a 268 nm

25 Preparación B



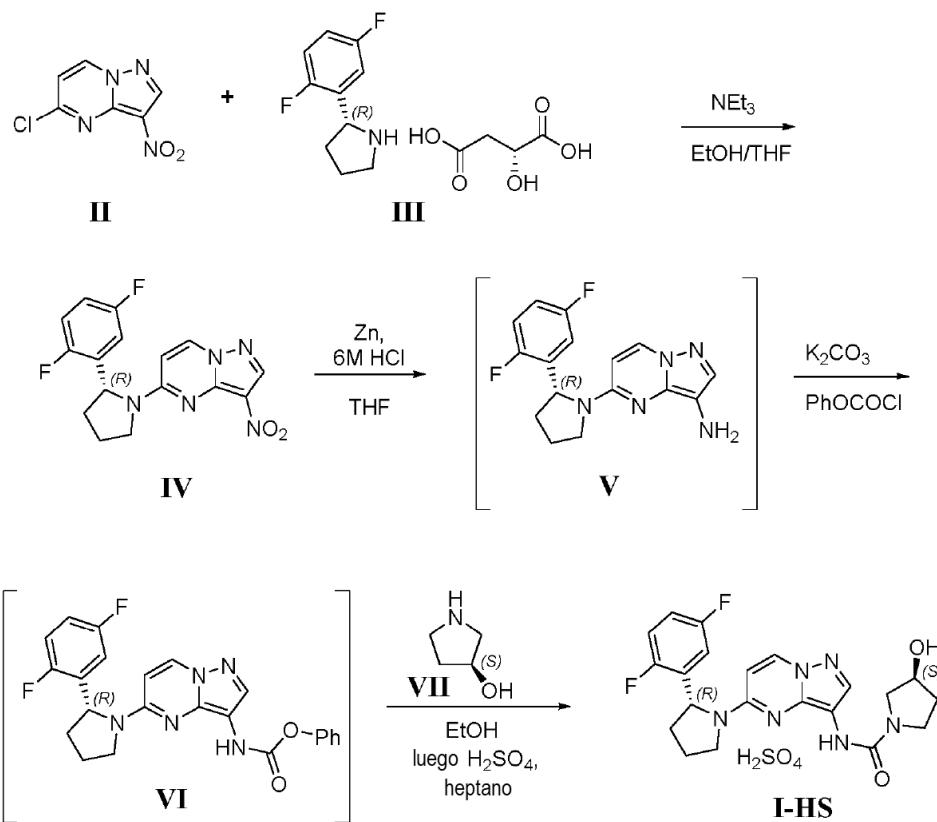
Preparación de (R)-2-hydroxisuccinato de (R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina

Paso A - Preparación de (4-(2,5-difluorofenil)-4-oxobutil)-carbamato de tert-butilo: Se disolvió 2-bromo-1,4-difluorobenceno (1.5 eq.) en 4 volúmenes de THF (basado en el peso de 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de tert-butilo) y se enfrió a aproximadamente 5° Celsius. Se añadió una solución de iPrMgCl 2.0 M en THF (1.4 eq.) durante 2 horas a la mezcla mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 25° Celsius. La solución se dejó enfriar hasta aproximadamente 5° Celsius y se agitó durante 1 hora (el análisis de GC confirmó la formación de Grignard). Se añadió una solución de 2-oxopirrolidin-1-carboxilato de tert-butilo (1.0 eq.) en 1 volumen de THF durante aproximadamente 30 min mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 25° Celsius. La reacción se agitó a aproximadamente 5° Celsius durante 90 min (2-oxopirrolidin-1-carboxilato de tert-butilo se confirmó en menos del 0.5% del área por HPLC). La reacción se inactivó con 5 volúmenes de HCl acuoso 2 M mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 45° Celsius. A continuación, la reacción se transfirió a un embudo de decantación añadiendo 10 volúmenes de heptano y eliminando la fase acuosa. La capa orgánica se lavó con 4 volúmenes de NaCl acuoso saturado seguido de la adición de 2 × 1 volumen de NaCl acuoso saturado. Se cambió el disolvente de la capa orgánica a heptano (<1% en peso de THF confirmado por GC) a una temperatura de destilación de 35-55° Celsius y una presión de destilación de 100-200 mm Hg para 2 × 4 volúmenes de heptano que se agregan con un mínimo volumen de destilación de aproximadamente 7 volúmenes. A continuación, la mezcla se diluyó a 10 volúmenes con heptano mientras se calentaba a aproximadamente 55° Celsius, lo que produjo un sólido más denso, dejándose enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. La suspensión se enfrió a menos de 5° Celsius y se filtró a través de tela filtrante de polipropileno. La torta húmeda se lavó con 2 × 2 volúmenes de heptano. Los sólidos se secaron al vacío a 55° Celsius hasta que el peso fue constante, obteniéndose (4-(2,5-difluorofenil)-4-oxobutil)-carbamato de tert-butilo como un sólido blanco con un rendimiento teórico de aproximadamente 75% a 85%.

Paso B - Preparación de 5-(2,5-difluorofenil)-3,4-dihidro-2H-pirrol: (4-(2,5-difluorofenil)-4-oxobutil)-carbamato de tert-butilo se disolvió en 5 vol. de tolueno con 2.2 eq. de HCl 12M añadiéndose observando una exotermia suave y desprendimiento de gas. La reacción se calentó a 65° Celsius durante 12-24 horas y se controló por HPLC. Una vez completada, la reacción se enfrió a menos de 15° Celsius con un baño de hielo/agua. El pH se ajustó a

- aproximadamente 14 con 3 equivalentes de NaOH acuoso 2 M (4.7 vol.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1-2 horas. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación con tolueno. Se eliminó la capa acuosa y se lavó la capa orgánica con 3 volúmenes de NaCl acuoso saturado. La capa orgánica se concentró hasta obtener un aceite y se volvió a disolver en 1.5 volúmenes de heptano. La suspensión resultante se filtró a través de un papel de filtro GF/F y se concentró hasta obtener un aceite amarillo claro de 5-(2,5-difluorofenil)-3,4-dihidro-2H-pirrol con un rendimiento teórico del 90% al 100%.
- 5 Paso C - Preparación de (*R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina: Dímero de cloro-1,5-ciclooctadieno iridio (0.2% en moles) y (*R*)-2-(2-(difenilfosfino)fenil)-4-isopropil-4,5-dihidrooxazol (0.4% en moles) se suspendieron en 5 volúmenes de MTBE (basado en 5-(2,5-difluorofenil)-3,4-dihidro-2H-pirrol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 hora y la mayoría de los sólidos se disolvieron y la solución se volvió de color rojo oscuro. La formación del catalizador se monitorizó usando un detector HPLC/PDA. La reacción se enfrió a menos de 5° Celsius y el 5-(2,5-difluorofenil)-3,4-dihidro-2H-pirrol (1.0 eq.) se añadió usando un enjuague de 0.5 volúmenes de MTBE. Se añadió difenilsilano (1.5 eq.) durante aproximadamente 20 minutos mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 10° Celsius. La reacción se agitó durante 30 minutos por debajo de 10° Celsius y luego se dejó calentar a temperatura ambiente.
- 10 15 La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La terminación de la reacción se confirmó por HPLC y luego se enfrió a menos de 5° Celsius. La reacción se inactivó con 5 volúmenes de HCl acuoso 2 M manteniendo la temperatura por debajo de 20° Celsius. Despues de 10 minutos, se retiró el baño de hielo/agua y se permitió que la temperatura de reacción aumentara hasta la temperatura ambiente mientras se agitaba durante 2 horas. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación con 3 volúmenes de MTBE. La capa acuosa se lavó con 3.5 volúmenes de
- 20 25 MTBE seguido de la adición de 5 volúmenes de MTBE a la capa acuosa mientras se ajustaba el pH a aproximadamente 14 mediante la adición de 0.75 volúmenes de NaOH acuoso al 50%. La capa orgánica se lavó con 5 volúmenes de solución acuosa saturada de NaCl, luego se concentró hasta obtener un aceite y se diluyó con 3 volúmenes de MTBE. La solución se filtró a través de un filtro de tela de polipropileno y se enjuagó con 1 volumen de MTBE. El filtrado se concentró hasta obtener un aceite de (*R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina con un rendimiento teórico de 95% a 100% y con 75-85 % ee.
- 30 35 Paso D - Preparación de (*R*)-2-hidroxisuccinato de (*R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina: Se transfirió (*R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina (1.0 eq.) a un matraz de fondo redondo cargado con 15 volúmenes (corregidos por potencia) de EtOH (200 prf). Se añadió ácido D-málico (1.05 eq.) y la mezcla se calentó a 65° Celsius. Todos los sólidos se disolvieron a aproximadamente 64° Celsius. La solución se dejó enfriar a RT. A aproximadamente 55° Celsius, la solución se sembró con (*R*)-2-hidroxi-succinato de (*R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina (aproximadamente 50 mg, >97% ee) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A continuación, la suspensión se filtró a través de un filtro de tela de polipropileno y se lavó con 2 × 1 volúmenes de EtOH (200 prf). Los sólidos se secaron al vacío a 55° Celsius, dando (*R*)-2-hidroxi-succinato de (*R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina con un rendimiento teórico del 75% al 90% y con >96 % ee.
- Refiriéndose al Esquema 1, las bases adecuadas incluyen bases de amina terciaria, como trietilamina y K₂CO₃. Los disolventes adecuados incluyen etanol, heptano y tetrahidrofurano (THF). La reacción se realiza convenientemente a temperaturas entre 5° Celsius y 50° Celsius. El progreso de la reacción se controló generalmente por HPLC TRK1PM1.

Esquema 1



Compuestos II (5-cloro-3-nitropirazol[1,5-a]pirimidina) y III ((R)-2-hidroxisuccinato de ((R)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidina, 1.05 eq.) en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador mecánico, una sonda de temperatura J-Kem y un adaptador de N₂ para control de presión positiva de N₂. Se añadió una solución de EtOH:THF 4:1 (10 ml/g de compuesto II) y seguido de la adición de trietilamina (NEt₃, 3.50 eq.) a través de un embudo de adición con una temperatura que alcanza aproximadamente 40° Celsius durante la adición. Una vez que se completó la adición, la mezcla de reacción se calentó a 50° Celsius y se agitó durante 0,5-3 horas para producir el compuesto IV.

- 5 A un matraz de fondo redondo equipado con un agitador mecánico, una sonda de temperatura J-Kem y un compuesto IV de entrada de N₂ se añadió y seguido de la adición de tetrahidrofurano (10 mL/g de compuesto IV). La solución se enfrió a menos de 5° Celsius en un baño de hielo y se añadió Zn (9-10 eq.). A continuación, se añadió gota a gota HCl 6 M (9-10 eq.) a una tasa tal que mantuviera la temperatura por debajo de 30° Celsius (para una escala de 1 kg, la adición tardó aproximadamente 1.5 horas). Una vez que disminuyó la exotermia, se permitió que la reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó durante 30 a 60 minutos hasta que el compuesto IV no fue detectado por HPLC. En este momento, una solución de carbonato de potasio (K₂CO₃, 2.0 eq.) en agua (5 ml/g de compuesto IV) se añadió todo de una vez y seguido de una rápida adición gota a gota de cloruro de fenilo (PhOCOCl, 1.2 eq.). Se observó evolución de gas (CO₂) durante las dos adiciones anteriores, y la temperatura aumentó hasta aproximadamente 30° Celsius después de añadir cloruro de fenilo. La formación de carbamato se agitó a temperatura ambiente durante 30-90 min. El análisis de HPLC siguió inmediatamente para garantizar que menos del 1% del área para la amina estuviera presente y un alto rendimiento del compuesto VI en la solución.
- 10 20 A la solución anterior se añadió amina VII ((S)-pirrolidin-3-ol, 1.1 eq. basado en el rendimiento teórico para el compuesto VI) y EtOH (10 mL/g de compuesto VI). Se añadió el Compuesto VII antes o al mismo tiempo que EtOH para evitar la formación de impurezas de carbamato de etilo. La solución de EtOH anterior se concentró a un volumen mínimo (4-5 ml/g) usando el concentrador de lotes bajo presión reducida (los niveles de THF deben ser <5 % por GC) y EtOH (10 ml/g de compuesto VI) se volvió a añadir para dar un total de 10 ml/g. Luego, la reacción se calentó a 50° Celsius durante 9-19 horas o hasta que la HPLC mostró que el compuesto VI es inferior al 0.5% del área. A continuación, la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1.0 equiv. al compuesto VI) se añadió a través de un embudo de adición para producir el compuesto I-HS con la temperatura usualmente exotérmica a aproximadamente 30° Celsius.
- 15 25

Ejemplo 1**Preparación de Forma Cristalina (I-HS) (Método 1)**

(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (0.500 g, 1.17 mmol) se disolvió en EtOH (2.5 ml) y se enfrió a aproximadamente 5° Celsius. Se añadió ácido sulfúrico concentrado (0.0636 ml, 1.17 mmol) a la solución enfriada y se agitó durante aproximadamente 10 min, mientras se calentaba a temperatura ambiente. Se añadió lentamente metil tert-butil éter (MTBE) (2 ml) a la mezcla, dando como resultado que el producto se desmoldeara. A continuación, se añadió EtOH (2.5 ml) a la mezcla y se calentó aproximadamente a reflujo hasta que se disolvieron todos los sólidos. Tras enfriar a temperatura ambiente y agitar durante aproximadamente 1 hora, se formaron algunos sólidos. Despues de enfriar a aproximadamente 5° Celsius, los sólidos se filtraron y lavaron con MTBE. Despues de la filtración y secado al aire durante aproximadamente 15 minutos, se aisló sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida como un sólido.

Ejemplo 2**Preparación de Forma Cristalina (I-HS) (Método 2)**

Se añadió ácido sulfúrico concentrado (392 mL) a una solución de 3031 g de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida en 18322 ml de EtOH para formar la sal de sulfato de hidrógeno. La solución se sembró con 2 g de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida y la solución se agitó a temperatura ambiente durante al menos 2 horas para formar una suspensión de la sal de sulfato de hidrógeno. Se añadió heptano (2088 g) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante al menos 60 min. La suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con heptano/EtOH 1:1. A continuación, los sólidos se secaron al vacío a temperatura ambiente (la temperatura del horno se fijó en 15° Celsius).

La sal de sulfato de hidrógeno seca (6389 g de 4 lotes combinados) se añadió a una solución 5:95 p/p de agua/2-butanona (peso total 41652 g). La mezcla se calentó a aproximadamente 68° Celsius con agitación hasta que el porcentaje en peso de etanol fue de aproximadamente 0.5%, tiempo durante el cual se formó una suspensión. La suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con una solución 5:95 p/p de agua/2-butanona. Luego, los sólidos se secaron al vacío a temperatura ambiente (la temperatura del horno se fijó en 15° Celsius) para proporcionar la forma cristalina de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida.

Ejemplo 3**Preparación de forma amorfa AM (HS)**

A una solución de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (9.40 g, 21.94 mmol) en MeOH (220 ml) se añadió lentamente ácido sulfúrico (0.1 M en MeOH, 219.4 ml, 21.94 mmol) a temperatura ambiente bajo agitación rápida. Despues de 30 minutos, la reacción primero se concentró en un evaporador rotatorio hasta casi sequedad, luego en alto vacío durante 48 h para proporcionar una forma amorfa de sulfato de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (11.37 g, 21.59 mmol, 98.43 % de rendimiento). LCMS (apci m/z 429.1, M+H).

Ejemplo 4**Preparación de Sal HCl Cristalina de Fórmula I**

Una mezcla de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (0.554 g, 1.29 mmol) en EtOH (6 ml, prueba 200) y MTBE (10 ml) se calentó a 50 °C mientras se agitaba para obtener una solución, seguido de la adición de cloruro de hidrógeno (conc.) (0.108 ml, 1.29 mmol) en una porción. A continuación, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente primero, luego se enfrió a aproximadamente 5 °C en un baño de agua con hielo con agitación para inducir la cristalización. La suspensión se agitó durante 4 h en un baño de agua con hielo antes de filtrarla al vacío, la torta del filtro se enjuagó con MTBE y se secó al vacío a 55 °C hasta peso constante, produciendo clorhidrato de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (0.534 g, 89 % de rendimiento). LCMS (apci m/z 429.2, M+H).

Preparación de sal cristalina de HBr de Fórmula I

Una mezcla de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil)pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (0.505 g, 1.18 mmol) en EtOH (6 ml, prueba 200) y MTBE (10 ml) se calentó a 50 °C mientras se agitaba para obtener una solución, seguido de la adición de bromuro de hidrógeno (33% ac.) (0.213 ml, 1.18 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se calentó a reflujo hasta obtener una solución mayoritariamente transparente con una pequeña cantidad de residuo oleoso en la pared de vidrio del recipiente de reacción. Tras enfriar a temperatura

ambiente, apareció precipitación y solidificó el residuo aceitoso. La mezcla se calentó nuevamente a 50 °C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La suspensión se filtró al vacío, la torta del filtro se enjuagó con MTBE y se secó al vacío a 55 °C hasta peso constante, produciendo bromohidrato de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida cristalino (0.51 g, 85% de rendimiento). LCMS (apci m/z 429.3, M+H).

Preparación de sal de mesilato cristalino de fórmula I

Una mezcla de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (0.532 g, 1.24 mmol) en EtOH (2.7 ml, prueba 200) y MTBE (5.3 ml) se calentó a 50 °C mientras se agitaba para obtener una solución, seguido de la adición de ácido metanosulfónico (0.076 ml, 1.24 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se calentó a reflamo para obtener una solución mayormente transparente con una pequeña cantidad de partículas. Tras enfriar a temperatura ambiente, apareció precipitación junto con algún residuo aceitoso. Se añadieron EtOH (0.5 ml, prueba 200) y ácido metanosulfónico (0.010 ml) adicionales para obtener una solución. La mezcla de reacción se calentó nuevamente a 50 °C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La suspensión se filtró al vacío, la torta del filtro se enjuagó con MTBE y se secó al vacío a 55 °C hasta peso constante, produciendo metanosulfonato de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida cristalino (0.51 g, 78% de rendimiento). LCMS (apci m/z 429.4, M+H).

Preparación de sal de camsilato cristalino de fórmula I

Una mezcla de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida (0.500 g, 1.17 mmol) y ácido S-(+)-canforsulfónico (0.271 g, 1.17 mmol) en EtOH (3 mL, prueba 200) y MTBE (5 mL) se calentó a reflamo mientras se agitaba hasta obtener una solución. Tras enfriar a temperatura ambiente, apareció la precipitación. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante la noche, luego se filtró al vacío, la torta del filtro se enjuagó con MTBE y se secó al vacío a 55 °C hasta peso constante, produciendo ((1S,4R)-7,7-dimetil-2-oxobiciclo[2.2.1]heptan-1-il)metanosulfonato de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))pirrolidin-1-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida.

Ejemplo 5

Comparación de sales de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida

Otras formas de sal de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida, por ejemplo, cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, mesilato y sales de camsilato (véase el Ejemplo 4), se compararon con la forma cristalina (I-HS) determinando su punto de fusión por calorimetría diferencial de barrido (DSC), la ganancia de peso por sorción dinámica de vapor (DVS) y la estabilidad en un portaobjetos de aluminio a 40° Celsius y 75% de humedad relativa (HR). La medición de DSC y DVS se realizó como se describe anteriormente y los resultados se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas de las sales cristalinas de (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-difluorofenil))-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida

Sal Cristalina	Inicio del punto de fusión DSC al máximo	Aumento de peso DVS (resultado)	Estabilidad a 40° Celsius/75 % HR (portaobjetos de aluminio)
Sulfato de hidrógeno (I-HS)	186-206°Celsius	~1 % de ganancia al 80 % de HR A 2 % de ganancia al 95 %	10 días Sin cambio de forma
		HR Sin cambios	
HCl	124-134°Celsius	~1% de ganancia al 50% de HR a 50-60% HR se produjo un cambio de forma	Después de 1 hora se produjo un cambio de forma
HBr	177-185°Celsius	~3.9 % de ganancia al 80 % de HR ~25 % de ganancia al 90 % de HR (deliquescencia)	Después de 2 semanas se volvió amorfó

Sal Cristalina	Inicio del punto de fusión DSC al máximo	Aumento de peso DVS (resultado)	Estabilidad a 40° Celsius/75 % HR (portaobjetos de aluminio)
Mesilato	183-186°Celsius	~9 % de ganancia al 80 % de HR ~50 % de ganancia a 90 % de HR (cristalino)	Delicado durante la noche
Camsilato	170-183°Celsius	No probado	No probado

Ejemplo 6

Ensayo de enzimas TrkA y TrkB

La afinidad de un compuesto que se une a la quinasa Trk se mide utilizando el sistema Lanthaseen™ Eu Kinase Binding technology. de Invitrogen. En resumen, el dominio citoplásmico Trk humano recombinante marcado con His de Invitrogen (5 nM TRK A - Cat. No. PV3144 o 10 nM TRK B – Cat No. PV3616) se incuba con Alexa-Fluor® 5 nM Tracer 236 (PR9078A), anti-His biotinilado 2 nM (Cat. No. M4408) y estreptavidina marcada con europio 2 nM (Cat. No. PV5899) junto con el compuesto de prueba en un tampón que consiste en MOPS 25 mM, pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, 0.005% Triton X-100 y DMSO al 2%. El compuesto normalmente se prepara en una dilución en serie de tres veces en DMSO y se agrega al ensayo para dar la concentración final adecuada. Después de una incubación de 60 minutos a 22 °C, la reacción se mide utilizando un lector de placas multimodo PerkinElmer EnVision a través de la detección de longitud de onda dual TR-FRET, y el porcentaje de control (POC) se calcula utilizando un factor de emisión radiométrico. Se determina 100 POC sin usar compuesto de prueba y 0 POC se determina usando una concentración de compuesto de control que inhibe completamente la enzima. Los valores POC se ajustan a una curva logística de 4 parámetros y el valor IC₅₀ es el punto donde la curva cruza 50 POC. La forma cristalina (I-HS) tuvo un IC₅₀ promedio de 8.4 nM cuando se probó en este ensayo para TrkA y un IC₅₀ promedio de 4.2 cuando se probó en este ensayo para TrkB.

Ejemplo 7

Las proteínas de fusión TRK impulsan la oncogénesis y son inhibidas por la Forma cristalina (I-HS)

Se realizó un conjunto de experimentos para determinar si la forma cristalina (I-HS) inhibiría la proliferación celular en tres modelos diferentes de líneas celulares de cáncer que albergan diferentes fusiones del gen Trk: línea celular CUTO-3F, línea celular KM12 y una línea celular MO-91. La célula CUTO-3F se deriva de un paciente con adenocarcinoma de pulmón que alberga la fusión del gen MPRIP-NTRK1. La línea celular KM12 es una línea celular de cáncer colorrectal que alberga la fusión TPM3-NTRK1 (Vaishnavi et al., Nature Med. 19:1469-1472, 2013). La línea celular MO-91 se deriva de un paciente con leucemia mieloide aguda que alberga la fusión ETV6-NTRK3 (Taipale et al., Nature Biotech. 31:630-637, 2013). La medición de la proliferación de las células después del tratamiento con la forma cristalina (I-HS) demostró una inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis en las tres líneas celulares probadas (Figuras 8-10). La IC₅₀ fue inferior a 100 nm para las células CUTO-3F (Figura 8) e inferior a 10 nm para las células KM12 y MO-91 (Figuras 9 y 10, respectivamente).

En consonancia con la inhibición de la proliferación celular, se observó inhibición de la fosforilación de la oncoproteína MPRIP-TRKA y ERK1/2 en las células CUTO-3F usando dosis bajas de la forma cristalina (I-HS) (Figura 11), inhibición de la fosforilación de TPM3-TRKA, pAKT y pERK1/2 en las células KM12 utilizando dosis bajas de la forma cristalina (I-HS) (Figura 12), e inhibición en la fosforilación de la oncoproteína TEL-TRKC (codificada por ETV6-NTRK3), pAKT y pERK1/2 en las células MO-91 usando dosis bajas de la forma cristalina (I-HS) (Figura 13). Juntos, estos datos muestran que las proteínas de fusión Trk son constitutivamente activas y regulan las rutas de señalización corriente abajo críticas, tal como MAPK y AKT, y son inhibidas por la forma cristalina (I-HS). Estos datos también indican que la forma cristalina (I-HS) se puede usar para tratar diferentes tipos de cáncer que expresan una Trk desregulada (por ejemplo, una forma constitutivamente activa de una proteína Trk (por ejemplo, una proteína de fusión Trk o una mutación puntual de Trk)).

Ejemplo 8

La forma cristalina (I-HS) trató con éxito a un sujeto con sarcoma indiferenciado

Una mujer de 41 años se presentó con una masa firme en la ingle izquierda. Se utilizaron imágenes iniciales para confirmar una masa de 10 cm dentro de la musculatura de la parte anterior del muslo. Una biopsia abierta reveló un sarcoma indiferenciado. Las exploraciones de estadificación iniciales demostraron múltiples nódulos pulmonares bilaterales de 4-13 mm compatibles con enfermedad metastásica. La mujer se inscribió en un ensayo de fase 2 de sorafenib con quimioterapia, radiación preoperatoria y cirugía conservadora de extremidades (ClinicalTrials.gov número NCT02050919). Tras dos semanas de sorafenib administrado a 400 mg diarios, la paciente recibió epirubicina

5 a 30 mg/m² diariamente e ifosfamida a 2.500 mg/m² diariamente con mesna durante tres días consecutivos, con continuación de sorafenib diario. El tumor se volvió progresivamente más doloroso durante estas cinco semanas de terapia sistémica. Durante la simulación para la radiación preoperatoria, se observó la extensión del tumor cranealmente dentro del músculo psoas, lo que impidió la administración segura de dosis de radiación efectivas debido a la toxicidad intestinal prevista. Por lo tanto, el paciente salió del protocolo y se procedió a la resección quirúrgica.

10 La resección del tumor primario logró márgenes negativos y la revisión del espécimen patológico confirmó 90% de necrosis tumoral. Una tomografía computarizada de tórax de reestadificación (que se muestra en la Figura 21A) obtenida 9 semanas después de que las exploraciones iniciales mostraron un empeoramiento de la enfermedad metastásica, con el nódulo más grande ahora midiendo 18 mm. El curso postoperatorio del paciente se complicó por una infección polimicrobiana de la herida que requirió desbridamiento repetido de la herida y terapia prolongada con antibióticos. Se obtuvo una TC de tórax repetida antes de reanudar la quimioterapia y se demostró una progresión espectacular durante las 9 semanas anteriores, con múltiples nódulos pulmonares de más de 3 cm, el más grande de casi 7 cm y un gran derrame pleural izquierdo. Después de la colocación de un drenaje pleural tunelizado y el inicio de oxígeno domiciliario suplementario, el paciente recibió doxorubicina a 75 mg/m² una vez, mientras espera la inscripción para el tratamiento con la forma cristalina (I-HS).

15 La biopsia tumoral abierta de diagnóstico del paciente se analizó utilizando el panel FoundationOneHeme (Foundation Medicine, Cambridge, MA). Este ensayo de perfil genómico extenso (CGP) multiobjetivo que utiliza la secuenciación de ADN y ARN de cientos de genes relacionados con el cáncer demostró la presencia de una fusión de genes que codifica los exones 1-2 del gen lamin A/C (LMNA) y los exones 11-17 del gen NTRK1 que da como resultado el gen de fusión LMNA-NTRK1 (Figura 14). CGP también mostró la pérdida del supresor de tumores CDKN2A/B (no mostrado), pero ninguna otra mutación oncogénica conocida.

20 Posteriormente, un ensayo de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) separado realizado en la muestra del tumor del paciente exhibió un patrón predominantemente único de 3' NTRK1 (señal de fluorescencia roja) en el 64 % de los núcleos tumorales, lo que concuerda con una alteración genómica que involucra el locus del gen NTRK1, probablemente secundario a una eliminación genómica entre los dos genes dada la ubicación y orientación de LMNA y NTRK1 en el brazo grande del cromosoma 1 (Figura 15). La expresión de ARNm del novedoso transrito de fusión de la fusión génica se confirmó mediante RT-PCR y secuenciación (Figura 16).

25 Se realizó un novedoso ensayo de ligadura de proximidad (PLA) utilizando la muestra de tumor del paciente para evaluar tanto la expresión de la proteína como la actividad funcional de la oncoproteína de fusión. Los PLA son únicos porque pueden detectar complejos de señalización funcional entre una quinasa y uno de sus adaptadores *in situ*. En este ensayo, se midió TRKA complejado con su adaptador preferido, SHC1, que se une a Y496 en el dominio de quinasa TRKA (Figura 17). El ensayo se validó tanto en líneas celulares humanas como en muestras tumorales de xenoinjertos tumorales derivados de pacientes (PDX) fijados con formalina (Figura 18). Se descubrió que la eliminación de ARNi de NTRK1 interrumpe los complejos TRKA-SHC1 en la línea celular CUTO-3 que alberga el gen de fusión MPRIP-NTRK1 (Figura 18A-C) al igual que la inhibición con la forma cristalina (I-HS) (Figura 18D y 18E). El TRK PLA detecta complejos de señalización funcional en una muestra de tumor FFPE de un xenoinjerto derivado del paciente (PDX), CULC001, que alberga las fusiones del gen MPRIP-NTRK1 pero no el PDX CULC002, que no alberga una mutación conductora oncogénica conocida (Figura 18F y 18G). El TRK-SHC PLA también puede detectar complejos de señalización no oncogénicos como lo muestra una señal positiva en una región del tejido nervioso periférico del CULC001 PDX, donde la familia de receptores TRK tiene una alta expresión y una actividad mediada por las neurotrofinas. La aplicación de este ensayo a la muestra de tumor del paciente demostró una señalización sólida asociada con los núcleos tumorales, pero solo una señal débil en el vaso sanguíneo (las células endoteliales humanas expresan TRKA, en consonancia con la señalización oncogénica de la oncoproteína LMNA-TRKA (Figura 19A y B). TRK-SHC1 PLA demostró un resultado negativo en una muestra de tumor de un paciente con ALK+ NSCLC, mientras que ALK-GRB2 PLA fue positivo (Figura 20), lo que demuestra aún más la capacidad de este ensayo para detectar señales oncogénicas en muestras de tumores humanos.

30 45 50 La presencia de la fusión LMNA-NTRK1 detectada por el ensayo FoundationOneHeme y luego validada por FISH y RT-PCR combinada con la evidencia de la expresión de la proteína TRKA y la actividad funcional de la ruta TRK en la muestra del tumor del paciente sugiere que el paciente tiene un cáncer impulsado por TRK adecuado para el tratamiento con un inhibidor específico de TRK.

55 Sobre la base de múltiples líneas de datos de biomarcadores genéticos y funcionales que sugerían la presencia de un oncogén controlador de TRK, se remitió al paciente para considerar su inscripción en el ensayo de fase 1 de la forma cristalina (I-HS). Un mes después, se consideró que el paciente era elegible para el ensayo y proporcionó su consentimiento informado por escrito. La tomografía computarizada de referencia mostró una progresión tumoral continua con múltiples metástasis pulmonares grandes en ambos pulmones, aunque el derrame pleural se resolvió después de la colocación del drenaje pleural (Figura 21C). En la presentación clínica, el paciente tenía disnea de esfuerzo significativa y requirió 5 litros de oxígeno suplementario para mantener una saturación de oxígeno del 90 %. Los valores de laboratorio de referencia fueron notables por un nivel elevado del marcador tumoral CA125 (Figura 22). El paciente recibió una dosis inicial de 100 mg de la forma cristalina (I-HS) tres días antes del inicio de la dosificación continua, seguida de la misma dosis aproximadamente 12 horas después el mismo día, con 48 horas de evaluación farmacocinética y de seguridad como según el protocolo del estudio. El paciente comenzó el ciclo 1 día 1 tres días

después. El paciente fue visto semanalmente para análisis farmacocinéticos y de seguridad. No se observaron eventos adversos relacionados con el fármaco y la paciente experimentó una mejora semanal en su disnea de esfuerzo durante este período de 4 semanas. Los niveles de CA125 se normalizaron durante el ciclo 1. Se realizó una TC antes del inicio del ciclo 2 el día 1, que demostró una marcada mejoría en las metástasis pulmonares múltiples y se consideró una respuesta parcial según RECIST 1.1. Se realizó una CT repetida antes del día 1 del ciclo 3 y demostró una respuesta en curso y, por lo tanto, confirmó una respuesta parcial mediante RECIST 1.1 (Figura 21C). Clínicamente, el paciente había mejorado significativamente la disnea de esfuerzo y ya no necesitaba oxígeno suplementario con una saturación de oxígeno del 97 % con aire ambiente. Después de cuatro meses de dosificación, el paciente no tuvo ningún evento adverso atribuido a la forma cristalina (I-HS). Estos datos muestran que la forma cristalina (I-HS) es capaz de tratar un sarcoma indiferenciado en un sujeto, así como otros cánceres que tienen una proteína Trk desregulada (por ejemplo, una forma constitutivamente activa de una proteína Trk, por ejemplo, proteínas de fusión Trk o mutaciones puntuales Trk).

La fusión del gen LMNA-NTRK1 se ha informado previamente en los nevos de Spitzoid y se activa constitutivamente cuando se expresa en células, lo que resulta en la activación de ERK1/2, AKT y PLCy, lo que demuestra su oncogenicidad (Taipale et al., Nature Biotech. 31:630-637, 2013). Foundation Medicine (FM) analizó previamente 1272 muestras de sarcoma de tejidos blandos con la prueba FoundationOneHeme CGP, lo que resultó en la detección de 8 fusiones NTRK1 o NTRK3, incluido el paciente descrito en este informe de caso (Tabla 15). En particular, 6 de los 8 pacientes con sarcoma con fusiones NTRK tienen menos de 25 años (exacto de Fisher, valor $P = 4 \times 10^{-4}$) y 4 de los 8 tienen menos de 5 años (exacto de Fisher, valor $P = 2 \times 10^{-5}$), lo que indica una mayor tasa de detección de fusiones de NTRK entre pacientes pediátricos (4.1%; CI del 95 %, 1.8 %-9.3 %) y, en particular, entre los menores de 5 años (14.3%; CI del 95 %, 5.7 %-31.5 %). También de interés, una de las fusiones de genes detectadas combina la mayoría del gen NTRK3 (exón 1-17) con el extremo 3' del gen HOMER2 (exones 2-9), que contiene un dominio de dimerización (dominio de bobina enrollada), y por lo tanto representa un evento de fusión de genes 3' que ahora se ha descrito para muchos otros genes que codifican RTK como EGFR, AXL y FGFR3 (Sleijfer et al., Eur. J. Cancer 46:72-83, 2010; Linch et al., Clin. oncol. 11:187-202, 2014; Rutkowski et al., J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 25:264-270, 2011).

Tabla 15. Características clínicas y detalles del gen de fusión NTRK de pacientes con sarcoma de tejido blando

Histología	5' gen	5' último exón	3' gen	3' primer exón	Género	Edad
sarcoma de tejidos blandos (nos) (n=179)	LMNA	2	NTRK1	11	F	41
sarcoma de tejidos blandos (nos) (n=179)	LMNA	10	NTRK1	11	M	22
fibrosarcoma de tejidos blandos (n=28)	LMNA	10	NTRK1	12	M	menores de 5 años
fibrosarcoma de tejidos blandos (n=28)	SQSTM1	2	NTRK1	10	F	menores de 5 años
schwannoma de tejidos blandos (n=3)	TPM3	7	NTRK1	10	M	menores de 5 años
hemangioma de tejidos blandos (n=4)	ETV6	5	NTRK3	15	F	menores de 5 años
tumor fibroso solitario de tejidos blandos (n=28)	TFG	6	NTRK3	14	M	17
sarcoma de tejidos blandos (nos) (n=179)	NTRK3	17	HOMER2	2	F	68

Además, se realizó un experimento para mostrar que la forma cristalina (I-HS) inhibe específicamente la actividad de una quinasa Trk. Por ejemplo, la forma cristalina (I-HS) no inhibió la proliferación celular de una línea celular HCC78 derivada de un cáncer de pulmón de células no pequeñas que expresa la proteína de fusión SLC34A2-ROS1 (Figura 23) (Vaishnavi et al., NatMed. 19:1469-72, 2013).

Materiales y métodos

Ensayo clínico

NCT02122913 es un estudio multicéntrico de fase 1 de aumento de dosis en curso que evalúa la seguridad y la farmacocinética de la forma cristalina (I-HS), una pan-TRK selectiva, en pacientes no seleccionados con tumores sólidos metastásicos o avanzados sin opciones de terapia estándar. El estudio está aprobado por las Institutional Review Boards en todas las instituciones que inscriben pacientes, y los pacientes elegibles brindan su consentimiento informado por escrito para participar. La forma cristalina (I-HS) se proporciona en cápsulas de 100 mg. Los pacientes inscritos reciben dosis crecientes de la forma cristalina (I-HS) de acuerdo con un diseño 3+3 modificado, y reciben la forma cristalina (I-HS) diariamente o dos veces al día hasta toxicidad intolerable, progresión de la enfermedad o retiro del consentimiento. En pacientes con enfermedad medible, la eficacia se evalúa según los criterios RECIST 1.1.

Secuenciación de próxima generación (NGS)

El ADN y el ARN se extrajeron y las bibliotecas de secuenciación ligadas al adaptador se capturaron mediante hibridación en solución utilizando conjuntos de cebo personalizados dirigidos a 405 genes relacionados con el cáncer y 31 genes reorganizados con frecuencia por DNA-seq, y 265 genes reorganizados con frecuencia por RNA-seq (FoundationOne Heme). Todas las bibliotecas capturadas se secuenciaron a gran profundidad (Illumina HiSeq) en un laboratorio acreditado por CAP certificado por CLIA (Foundation Medicine), con un promedio de >500x para ADN y >6 millones de pares únicos para ARN. Los datos de secuencia de ADNg y ADNc se asignaron al genoma humano de referencia (hg19) y se analizaron a través de un canal de análisis computacional para detectar alteraciones genómicas presentes en la muestra, incluidas sustituciones, inserciones y eliminaciones cortas, reordenamientos y variantes del número de copias.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

La FISH de ruptura de NTRK1 se realizó en portaobjetos de 4 micras de muestras tumorales fijadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE), como se describió anteriormente, utilizando Vysis LSI NTRK1 (Cen) SpectrumGreen (Cat # 08N43-030) y Vysis LSI NTRK1 (Tel) SpectrumRed (Abbott Molecular, # 08N43-030 y 08N43-020, respectivamente) (Vaishnavi et al., Cancer Discov. 5:25-34, 2015).

RT-PCR y Secuenciación de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó como se describió anteriormente usando el cebador directo para LMNA (LMNA F1, 5'gagggcgagctgcataat3'; SEQ ID NO: 1) (Weisner et al., Nat. Comm. 5:3116, 2014) y el cebador inverso a NTRK1 (NTRK1 Y490rev, 5'cgccgcctgtatgttttgcac3'; SEQ ID NO: 2). La secuenciación de ADN del producto de RT-PCR se realizó utilizando la secuenciación de ADN de Sanger en el Pathology Core de la Universidad de Colorado.

Líneas celulares

Se obtuvo el consentimiento informado para derivar líneas celulares inmortales del paciente. La línea celular CUTO-3 y sus derivados se iniciaron a partir del derrame pleural maligno de un paciente con adenocarcinoma de pulmón en estadio IV que albergaba la fusión del gen MPRIP-NTRK1 como se describió anteriormente (Vaishnavi et al., Cancer Discov. 5:25-34, 2015; Davies et al., PLoS One 8:e82236, 2013). KM12 y MO-91 se han descrito previamente (Vaishnavi et al., Nature Med. 19:1469-1472, 2013; Taipale et al., Nat. Biotech. 31:630-637, 2013).

Generación de xenoinjertos derivados del paciente

Se obtuvo el consentimiento informado del paciente para generar xenoinjertos murinos derivados del paciente. El tejido tumoral de un paciente con adenocarcinoma de pulmón con oncogén negativo (CULC001) se cortó en piezas de 3 × 3 × 3 mm que se transfirieron a DMEM complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y 200 unidades/ml de penicilina y 200 u g/ml de estreptomicina. Las piezas de tumor se sumergieron en matriz (Corning) y se insertaron en incisiones en cada flanco de 5 ratones desnudos. Se centrifugó el líquido pleural (CULC002) de un paciente con adenocarcinoma de pulmón que albergaba una fusión del gen MRP1P-NTRK1 y el sedimento celular resultante se suspendió en 5 ml de tampón ACK (Lonza) durante 2 minutos, lo que permitió la lisis completa de los glóbulos rojos. La lisis se detuvo mediante la adición de 20 ml de PBS y la centrifugación de las muestras. El sedimento se lavó dos veces con PBS antes de suspenderlo en medio suplementado con DMEM como anteriormente. 100 µl de células (1 × 10⁶ por flanco) suspendidos en una mezcla 1:1 de DMEM y Matrigel (BD) se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de 5 ratones desnudos. La propagación y el mantenimiento de los xenoinjertos resultantes se describieron previamente (Keysar et al., Mol. oncol. 7:776-790, 2013).

Ensayos de ligadura de proximidad

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio (en una placa de 48 pocillos) o portaobjetos de cámara a 25-75k células/pocillo. Las células se trataron con las dosis y tiempos indicados y luego se fijaron durante 15 minutos mediante agitación a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4%. Las células se enjuagaron dos veces en PBS, y luego

se usó el kit Duolink® PLA® *in situ* de SigmaAldrich en ratón/conejo (Rojo) de acuerdo con el protocolo del fabricante (catálogo # DUO92101). Las concentraciones de anticuerpos se optimizaron mediante inmunofluorescencia antes de los experimentos con PLA. Las PLA de tejido FFPE de ratones o pacientes se prepararon como se describe en histología. Además, las muestras se trataron con glicina 300 mM durante 15 minutos antes del paso de bloqueo; de lo contrario, el ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se montaron utilizando el reactivo antidesvanecimiento Prolong® gold. (con DAPI) y curado durante la noche antes de la toma de imágenes. Las imágenes se tomaron en un microscopio fluorescente invertido estándar de Nikon a 40x, o en el disco confocal giratorio 3I Marianas en el núcleo de microscopía de luz avanzada del campus médico Anschutz de la Universidad de Colorado a 40x o 100x. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: TRK (C17F1) y ALK (D5F3) de Cell Signaling, SHC1 de Novus y Grb2 (610111) de BD.

Ensayos de proliferación

Todos los ensayos de proliferación se realizaron en medios suplementados con FBS al 5% como se describió anteriormente utilizando Cell Titer 96 MTS (Promega) (Bouhana et al., EORTC-NCI-AACR 26th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Barcelona, España 2014). Las células se sembraron de 500 a 2000 células/pocillo y se trataron durante 72 horas a las concentraciones de fármaco descritas en cada gráfico. Cada ensayo se realizó por triplicado en al menos 3 réplicas biológicas independientes. Los datos se trazaron y los valores de IC50 se calcularon utilizando el software GraphPad.

Inmunotransferencia

La inmunotransferencia se realizó como se describió anteriormente (Vaishnavi et al., Nature Med. 19:1469-1472, 2013). En resumen, las células se sometieron a lisis en tampón RIPA con Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) y se diluyeron en tampón de carga (LI-COR Biosciences). Las membranas se escanearon y analizaron usando el sistema de imágenes Odyssey y el software (LI-COR). Se usaron los siguientes anticuerpos de Cell Signaling: pTRK Y490 (policlonal de conejo, No. 9141), pERK1/2 XP T202/Y204 (No. 9101), ERK1/2 total, pAKT S473 (mAb de conejo, No. 4060) y clon de ratón AKT total D3A7 (#2920). El anticuerpo polyclonal de conejo TRK (C-14) se adquirió de Santa Cruz Biotechnology. GAPDH (MAB374) y pTYR (4G10) son de Millipore.

Análisis estadístico

Los intervalos de confianza para la tasa de detección de fusiones de NTRK en muestras de pacientes con sarcoma se calcularon mediante la prueba de proporciones de 1 muestra. La clasificación de la histología de la enfermedad se basó en la ontología de la enfermedad de Foundation Medicine. El enriquecimiento de las fusiones de NTRK en grupos de pacientes más jóvenes se probó mediante la prueba exacta de Fisher. Todas las pruebas estadísticas se realizaron en R v 3.1.3.

Ejemplo 9

Seguridad clínica y actividad de un estudio de fase 1 de forma cristalina (I-HS), un inhibidor selectivo de TRKA/B/C, en pacientes con tumores sólidos con fusiones del gen NTRK

Métodos

En este estudio de Fase I en curso, abierto, multicéntrico, de escalada de dosis 3+3 de forma cristalina (I-HS), se inscribieron 23 pacientes con tumores sólidos refractarios a la terapia estándar, función hematopoyética y de órganos principales normales. La forma cristalina (I-HS) se administró por vía oral como una dosis única, seguida de dosis QD o BID durante ciclos continuos de 28 días. La respuesta se mide con los Criterios RECIST, versión 1.1. El suero se recolecta para el análisis farmacocinético en el Día 1 y el Día 8 del Ciclo 1. La información de seguridad se recopila en todos los pacientes y la definición de toxicidad limitante de la dosis se aplica a los eventos adversos independientemente de la relación con el producto en investigación.

Resultados

Hasta la fecha, 23 pacientes fueron tratados con cada uno de los primeros cinco niveles de dosis que van desde 50 mg QD-150 mg BID. La forma cristalina (I-HS) ha sido bien tolerada; no se ha alcanzado la MTD y los eventos adversos más comunes son fatiga de grado 1 y 2 (35 %), mareos (26 %) y anemia (22 %). Dos pacientes tuvieron toxicidades limitantes de la dosis (AST elevada, grado 3 (Nivel de dosis 150 mg BID) y delirio, grado 3 no relacionado (Nivel de dosis 100 mg BID)).

El análisis PK mostró que las concentraciones plasmáticas máximas de la forma cristalina (I-HS) se alcanzaron 30-60 minutos después de la dosificación y la exposición aumentó en proporción aproximada con la dosis. Los niveles de fármaco libre de la forma cristalina (I-HS) parecen suficientes para una inhibición de aproximadamente el 98 % de TRKA/B/C en concentraciones máximas en todos los niveles de dosis.

Tres de los 23 pacientes albergaban fusiones de NTRK y fueron tratados con 100 o 150 mg BID. Estos pacientes lograron una respuesta parcial: un sarcoma indiferenciado con una fusión LMNA-NTRK1 (59% de disminución; 7

ciclos+), un tumor del estroma GI (GIST) c-kit-negativo con una fusión *ETV6-NTRK3* (disminución del 30%; 2 ciclos+) y un carcinoma secretor análogo mamario con una fusión *ETV6-NTRK3* (disminución del 64%; 2 ciclos+). Estos datos están respaldados por inhibición y regresión del crecimiento tumoral *in vivo* en modelos de ratones con xenoinjerto de fusiones TRK.

5 Conclusiones

La forma cristalina (I-HS) ha sido bien tolerada y tiene una exposición sistémica suficiente para una inhibición sólida de las fusiones de NTRK, como lo demuestran los niveles farmacocinéticos del fármaco y las respuestas clínicas en curso observadas en los 3 pacientes de fusión de NTRK inscritos en este estudio. Estos datos validan aún más este objetivo molecular como un impulsor oncogénico en diversas histologías tumorales.

10 Ejemplo 10

Comparación de la forma cristalina (I-HS) y la sal de sulfato amorf

Se realizaron diversos experimentos para comparar las propiedades de sulfato de hidrógeno de (S)-N-(5-((R)-2-(2, 5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida amoro y la forma cristalina (I-HS). Estos estudios incluyen perfiles de impurezas, estabilidad, propiedades de flujo e higroscopidad. En los 15 siguientes estudios, se compararon dos lotes de material amoro (AM(HS)1 y AM(HS)2) con un solo lote de forma cristalina (I-HS). AM(HS)1 y AM(HS)2 se prepararon como se describe en el Ejemplo 3. La forma cristalina (I-HS) se preparó como se describe en el Ejemplo 2.

Métodos

Disolventes residuales

20 Las soluciones de AM(HS)1, AM(HS)2 y la forma cristalina (I-HS) se analizaron utilizando análisis de espacio de cabeza GC-MS.

Análisis termogravimétrico (TGA)

Muestras colocadas en bandejas de platino y sometidas a 10 °C/minuto hasta 300 °C.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

25 Las muestras se colocaron en crisoles de aluminio ondulado con un orificio en la tapa y se sometieron a 10 °C/minuto a 250 °C bajo nitrógeno.

Difracción de rayos X (XRD)

30 Radiación Cu K α a 44 kV, 40 mA a través de un filtro de Ni con una rendija de divergencia de 2/3°, rendija de divergencia HL de 10 mm, rendija de dispersión configurada en "Auto" (la rendija de dispersión está determinada por el ordenador/instrumento), rendija de recepción de 0.3 mm. Escaneo continuo de 3° a 40° 2θ a 2°/min; ancho de muestreo (tamaño de paso) de 0.02°/segundo, tiempo de paso de 0.4 puntos/segundo. Las muestras se rotaron en un plano paralelo a la superficie de la muestra a 60 rpm.

Microscopía de luz polarizada (PLM)

35 Las muestras se colocaron en un portaobjetos de vidrio, se bañaron en aceite de baja viscosidad y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. Examinado bajo un objetivo de 20x con lentes polarizados cruzados y un filtro de corte de 530 nm. Imágenes realizadas con una cámara PAX-It y procesadas por el software PAX-It.

Sorción dinámica de vapor (DVS)

1. La higroscopidad se estudió a 25 °C utilizando un analizador IGAsorp.
2. Se colocaron aproximadamente 15 mg de muestra en un portamuestras de malla tarada con una configuración de humedad ambiente inicial de ~ 35 %.
3. Durante todo el estudio se utiliza un caudal total de nitrógeno seco/húmedo de 250 cc/min.
4. Los sólidos se estudiaron realizando un ciclo completo del siguiente programa: 60 minutos de secado a 40 °C bajo N₂ seco, seguido de ajustes de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 95 % de HR, con el tiempo de exposición en cada punto de ajuste de humedad dependiendo del 99.5 % de confianza en el modelo de ajuste F1 o 60 minutos. El tiempo máximo permitido en cualquier punto de ajuste de humedad fue de 120 min. La muestra se mantuvo bajo N₂ seco después de que se completó el ciclo.

El porcentaje de ganancia de peso se calculó con base en el peso seco.

ES 2 941 630 T3

Parte uno: Caracterización física de la forma cristalina (I-HS)

AM(HS)1, AM(HS)2 y forma cristalina (I-HS) se caracterizaron por apariencia, disolventes residuales, análisis termogravimétrico (TGA), contenido de agua de Karl Fischer (KF), calorimetría diferencial de barrido (DSC), Difracción de Rayos X (XRD), Microscopía de Luz Polarizada (PLM) e higroscopicidad por Sorción Dinámica de Vapor (DVS).

5 Los datos para la caracterización física de los tres lotes se encuentran en las Tablas 16-19 y Figuras 24-38.

Tabla 16. Apariencia

Compuesto	Apariencia	Munsell #
AM (HS) 1	Polvo amarillo libre de agregados	7.5Y 9/10
AM (HS) 2	Polvo amarillo libre de agregados	7.5Y 9/10
I-HS cristalino	Polvo Naranja libre de agregados	2.5YR 7/10

Tabla 17. Disolventes residuales

Compuesto	Disolventes (ppm)					
	Etanol	metanol	Metil t-butil éter	heptano	tetrahidrofurano	Metiletilcetona
AM (HS) 1	no detectado	1075	no probado	no probado	no probado	no probado
AM (HS) 2	174	7369	no probado	no probado	no probado	no probado
I-HS cristalino	4783	no probado	no detectado	no detectado	no detectado	3046

10

Tabla 18. Análisis termogravimétricos y de Karl Fischer (contenido de agua)

Compuesto	Análisis termogravimétrico			KF (p/p %)
	Inicio (°C)	Parada (°C)	Cambio (%)	
AM (HS) 1	24.78	111.94	3.78	2.00
	111.94	186.94	3.09	
AM (HS) 2	31.53	100.21	1.94	0.88
	100.21	174.86	3.07	
I-HS cristalino	23.77	218.58	6.01	0.28

Tabla 19. Análisis de calorimetría diferencial de barrido

Compuesto	Calorimetría diferencial de barrido					
	Tipo	Inicio (°C)	Inicio (°C)	Máximo (°C)	Parada (°C)	ΔH (J/g)
AM (HS) 1	endotermia	28.7	29.9	68.3	115.8	153.7

Compuesto	Calorimetría diferencial de barrido					
	Tipo	Inicio (°C)	Inicio (°C)	Máximo (°C)	Parada (°C)	ΔH (J/g)
endotermia	124.1	126.1		152.8	191.0	58.3
	204.7	205.6		211.2	220.1	7.5
AM (HS) 2	endotermia	29.6	29.8	70.7	107.2	70.0
	endotermia	113.7	116.0	140.3	167.0	32.7
	endotermia	205.6	207.2	213.8	221.3	4.8
I-HS cristalino	endotermia	181.9	193.7	204.6	213.8	98.9

Conclusión de la caracterización física

Las formas API AM(HS) 1 y AM(HS)2 son amorfas sin birrefringencia por microscopía de luz polarizada y el patrón XRPD también es claramente amorfos para ambos lotes sin picos de difracción de rayos X perceptibles. La TGA para

- 5 los compuestos amorfos muestra una pérdida de peso gradual correspondiente a los eventos endotérmicos observados en la calorimetría diferencial de barrido. Los primeros dos eventos endotérmicos son bastante amplios y pueden indicar una evaporación y/o desolvatación. El último evento endotérmico ocurre a la temperatura aproximada de fusión observada en el material cristalino. Ambos lotes amorfos son bastante higroscópicos con una histéresis significativa tras la desorción. AM(HS)1 ganó más del 13 % de su masa original al 80 % de HR. Asimismo, AM(HS)2 10 ganó casi el 12 % de su masa inicial al 80 % de HR. El XRPD Post-DVS indica que no hubo cambio de forma durante la sorción dinámica de vapor; sin embargo, se observó que el polvo se delicuesció en el portamuestras, lo que dificultó la eliminación del polvo delicuente del portamuestras.

15 La forma cristalina (I-HS) es de naturaleza cristalina con muchos picos de difracción de rayos X y birrefringencia sincera por microscopía de luz polarizada en su morfología de aglomerado. La forma cristalina (I-HS) muestra una pérdida de peso termogravimétrica del 6 % correspondiente a un inicio de fusión endotérmica que se produce a 193.7 °C. La forma cristalina (I-HS) no es higroscópica y ganó solo el 1% de su masa inicial al 80% de HR.

Parte dos: Propiedades del polvo de forma cristalina (I-HS)

20 Los siguientes estudios compararon la sal de sulfato de hidrógeno cristalina con el polvo de sal de sulfato amorf, incluido un estudio de las propiedades de flujo de cada forma que son importantes para fabricar una forma de dosificación oral sólida, como una tableta o cápsula. El trabajo realizado incluye densidad a granel, densidad compactada, ángulo de reposo y perfiles de compresión.

Mezclas

25 Las mezclas se crearon de acuerdo con las formulaciones presentadas en las Tablas 20 y 21. Estas mezclas son típicas de formulaciones de tabletas que podrían fabricarse como una tableta o cápsula formulada basada en compresión directa o compactación con rodillo. El primer API (es decir, AM (HS) o forma cristalina (I-HS)), celulosa microcristalina (MCC) y almidón o lactosa se agregaron a una botella de vidrio ámbar de 30 cc y se mezclaron en el Agitador-mezclador TURBULA® a 25 rpm durante 3 minutos. Luego, los excipientes restantes se agregaron a la botella y se mezclaron en el TURBULA® a 25 rpm durante 3 minutos adicionales.

Tabla 20. Formulación de tabletas con 2:1 MCC:Lactosa, 50 % de carga de fármaco

Componente	Calificación	Objetivo	Porcentaje	Masa objetivo (g)	Cristalino	Amorfo
					Masa real (g)	Masa real (g)
API	NA	Substancia fármaco	50.00	2.500	2.5004	2.5009

ES 2 941 630 T3

Componente	Calificación	Objetivo	Porcentaje	Masa objetivo (g)	Cristalino	Amorfo
					Masa real (g)	Masa real (g)
MCC	PH102NF	diluyente	30.30	1.515	1.5152	1.5153
Lactosa	Fast-Flo 316	diluyente	15.20	0.760	0.7603	0.7602
Croscarmelosa sódica	Ac-Di-Sol	desintegrante	3.00	0.150	0.1503	0.1498
Dióxido de silicio	Cabosil	deslizante	1.00	0.050	0.0502	0.0497
Estearato de Mg	USP-NF	lubricante	0.50	0.025	0.0248	0.0254
		Total	100.00	5.000	5.0012	5.0013

Tabla 21. Formulación de tabletas con 1:1 MCC:Almidón, 50 % de carga de fármaco

Componente	Calificación	Objetivo	Porcentaje	Masa objetivo (g)	Cristalino	Amorfo
					Masa real (g)	Masa real (g)
API	N / A	Substancia fármaco	50.00	2.500	2.4994	2.4998
MCC	PH102NF	diluyente	22.75	1.138	1.1385	1.1387
Almidón pregelatinizado	StarCap 1500	diluyente	22.75	1.138	1.1385	1.1376
Croscarmelosa sódica	Ac-Di-Sol	desintegrante	3.00	0.150	0.1507	0.1503
Dióxido de silicio	Cabosil	deslizante	1.00	0.050	0.0500	0.0498
Estearato de Mg	USP-NF	lubricante	0.50	0.025	0.0252	0.0250
		Total	100.00	5.000	5.0023	5.0012

Angulo de reposo

- 5 El ángulo de reposo es el ángulo formado por la base horizontal de la superficie y el borde de una pila de gránulos en forma de cono. Se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{h}{r} \right)$$

- 10 El ángulo de reposo se midió vertiendo lentamente aproximadamente 1 g de muestra a través de un embudo con un diámetro interior de salida de 3/16". Luego, el polvo cayó 1 11/16" para aterrizar en la superficie de un plato de cristalización volcado sobre el cual se formó una pila de polvo. Se tomó una fotografía de la pila después de agregar todo el material. El ángulo entre la superficie del plato y la superficie de la pila se midió mediante un transportador en

las imágenes. Se tuvo cuidado de replicar las mismas posiciones y distancias de caída en la configuración entre diferentes muestras.

Densidades a granel y compactada

- 5 El polvo se añadió a un cilindro graduado de 10 mL previamente pesado a través de un embudo que no estaba en contacto directo con el cilindro graduado para evitar la transferencia de vibraciones. Se agregó polvo hasta alcanzar un volumen de 10 mL y luego se pesó el cilindro graduado con polvo. La densidad a granel fue calculada por *Densidad a granel* =

$$\frac{(Masa del cilindro + polvo) - Masa del cilindro vacío}{10mL}$$

Se extrajo la misma muestra en el cilindro graduado para la siguiente secuencia: 100, 150, 250, 250 compactaciones. El volumen se midió después de cada intervalo. La densidad

$$\frac{(Masa del cilindro + polvo) - Masa del cilindro vacío}{Volumen después de 750 compactaciones totales}$$

- 10 compactada fue calculada por *Densidad compactada* =

El índice de Carr se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI = \frac{\rho_{\text{compactada}} - \rho_{\text{a granel}}}{\rho_{\text{compactada}}} \times 100$$

La Relación de Hausner se calculó con la siguiente ecuación:

$$HR = \frac{\rho_{\text{compactada}}}{\rho_{\text{a granel}}}$$

15 Perfiles de compresión

- Los perfiles de compresión se generaron creando tabletas redondas de 5/16" de diámetro a cinco presiones de compresión diferentes para cada mezcla. Los ajustes de la prensa fueron un tiempo de permanencia de 1 segundo y una velocidad de bombeo del 15%. Se crearon tabletas para las cuatro mezclas de polvo utilizando fuerzas de compresión de 700 kg, 1000 kg, 1500 kg y 2000 kg. La fuerza de compresión más alta se seleccionó con base en los resultados de las tabletas anteriores. A continuación, se midieron la masa, las dimensiones y la fuerza de ruptura de la tableta. Estos datos se trazaron utilizando una plantilla que resultó en un gráfico de presión de compresión frente a resistencia a la tracción (Figura 39).

Resultados

Tabla 22. Valores de referencia

Carácter de flujo	Ángulo de reposo	relación de Hausner	Índice de compresibilidad (%)
Excelente	25-30°	1.00-1.11	≤10
Bien	31-35°	1.12-1.18	11-15
Justo	36-40°	1.19-1.25	16-20
Pasable	41-45°	1.26-1.34	21-25
Pobre	46-55°	1.35-1.45	26-31
Muy pobre	56-65°	1.46-1.59	32-27
muy, muy pobre	≥66°	≥1.60	≥38

Los resultados se presentan en las Tablas 23 y 24 y la Figura 39. De acuerdo con la Convención de la Farmacopea U.S. (USP), todas las muestras caen en la categoría aceptable o deficiente para el flujo medido por el ángulo de reposo. Los ángulos más grandes indican peor flujo. El Índice de Carr (Índice de Compresibilidad) y la Realción de Hausner están entre aceptables y muy pobres según la USP. El API cristalino es notablemente diferente del API amorfó y estas diferencias están presentes en todas las mezclas de formulación, independientemente del contenido de API amorfó o cristalino. Para el API cristalino, la relación de Hausner y el índice de Carr indican que las propiedades de flujo son "pasables". El API amorfó tiene propiedades de flujo considerablemente peores, clasificándose como "Muy pobre" tanto para la relación de Hausner como para el índice de Carr. Véase la Tabla 22 para las tablas USP relevantes.

Al crear tabletas para los perfiles de compresión, las mezclas cristalinas de API produjeron múltiples tabletas que se rompieron al ser expulsadas de la herramienta. Las mezclas de API amorfás parecían producir tabletas visualmente mejores, es decir, poca o ninguna rotura.

Tabla 23. Angulo de reposo

Muestra	$\theta(^{\circ})$	$\phi(^{\circ})$	Promedio($^{\circ}$)
L-ARR10-118	50.28	50.28	50.28
AR00457470-33	47.79	43.6	45.70
2:1 MCC:Lactosa L-ARR10-118	45.21	41.81	43.51
2:1 MCC:Lactosa AR00457470-33	41.01	42.64	41.83
1:1 MCC:Almidón L-ARR10-118	39.52	41.01	40.27
1:1 MCC:Almidón AR00457470-33	40.44	48.59	44.52

* θ y ϕ son los ángulos a ambos lados de la pirámide (2D).

15

Tabla 24. Densidades a granel y compactada

Muestra	Densidad a granel (mg/mL)	Densidad compactada (mg/mL)	Índice de Carr	Relación de Hausner
L-ARR10-118	594.8	762.6	22%	1.28
AR00457470-33	423.6	622.9	32%	1.47
2:1 MCC:Lactosa L-ARR10-118	435.3	621.9	30%	1.43
2:1 MCC:Lactosa L-AR00457470-33	408.1	583.0	30%	1.43
1:1 MCC:Almidón L-ARR10-118	437.9	625.5	30%	1.43
1:1 MCC:Almidón AR00457470-33	411.4	605.0	32%	1.47

ES 2 941 630 T3

Conclusión de las propiedades del polvo

Según el ángulo de reposo, las mezclas de formulación de forma cristalina (I-HS), el API amorf o las mezclas de formulación de API amorf probadas tienen características de flujo "muy pobres". Sin embargo, según el Índice de Carr y la Relación de Hausner, el API cristalino, la forma cristalina (I-HS), tiene características de flujo "pasables". Las propiedades de flujo significativamente mejores aquí son una ventaja para el desarrollo y la fabricación de formas sólidas de dosificación oral. Tampoco hubo una gran diferencia en el perfil de compresión de ambas mezclas con ambos lotes de polvo. Esto es una indicación de que el sulfato de hidrógeno de (S)-N-(*(R*)-2-(2,5-difluorofenil)-pirrolidin-1-il)-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxamida, ya sea amorf o cristalino, no afectó positiva o negativamente el flujo de las mezclas con una carga de fármaco del 50%.

Parte tres: Estabilidad de AM(HS)1 y forma cristalina (I-HS)

- 10 Se colocaron alícuotas de polvo de AM(HS)1 y forma cristalina (I-HS) en viales de centelleo de 20 ml sin tapa (abiertos) y los viales se colocaron en una bolsa de LDPE en una cámara de estabilidad mantenida a 40 °C/75 % HR durante cinco semanas. Al retirarlas de la cámara, las muestras se caracterizaron físicamente por apariencia, KF, TGA, DSC, XRD y PLM. Las muestras también se analizaron por HPLC en cuanto a pureza cromatográfica, integridad quiral y potencia. Cuando corresponda, los datos presentados en la porción de estabilidad también incluyen los datos originales de T=0 para propósitos de comparación. Los datos se pueden ver en las Tablas 25-29 y las Figs. 40-44.
- 15

Tabla 25. Apariencia de las muestras de estabilidad

Compuesto	Condición	Punto de tiempo (semanas)	Apariencia	Munsell #
AM (HS) 1	NA	0	Polvo amarillo libre de agregados	7.5Y 9/10
AM (HS) 1	40 °C/75 % HR	5	Polvo Naranja algunos agregados	2.5YR 7/10
Forma cristalina (I-HS)	NA	0	Polvo Naranja libre de agregados	2.5YR 7/10
Forma cristalina (I-HS)	40 °C/75 % HR	5	Polvo Naranja libre de agregados	2.5YR 7/10

Tabla 26. TGA y KF de Muestras de Estabilidad

Compuesto	Condición	Punto de tiempo (semanas)	Análisis termogravimétrico			KF (p/p %)
			Inicio (°C)	Parada (°C)	Cambio (%)	
AM (HS) 1	NA	0	24.78	111.94	3.78	2.00
			111.94	186.94	3.09	
AM (HS) 1	40 °C/75 % HR	5	36.27	217.16	5.32	0.56
Forma cristalina (I-HS)	NA	0	23.77	218.58	6.01	0.28
Forma cristalina (I-HS)	40 °C/75 % HR	5	36.66	217.87	6.00	0.21

ES 2 941 630 T3

Tabla 27. DSC de Muestras de Estabilidad

Comp.	Condición	Punto de tiempo (semanas)	Calorimetría diferencial de barrido					
			Tipo	Inicio (°C)	Inicio (°C)	Máximo (°C)	Parada (°C)	ΔH (J/g)
AM (HS) 1	NA	0	endoterma	28.7	29.9	68.3	115. 8	153.7
			endoterma	124.1	126.1	152.8	191. 0	58.3
			endoterma	204.7	205.6	211.2	220. 1	7.5
AM (HS) 1	40 °C/75 % HR	5	endoterma	182.7	196.7	206.3	217. 7	95.9
Forma cristalina (I-HS)	NA	0	endoterma	181.9	193.7	204.6	213. 8	98.9
Forma cristalina (I-HS)	40 °C/75 % HR	5	endoterma	181.3	193.4	204.1	214. 1	99.4

Tabla 28. Datos de HPLC de muestras de estabilidad

Compuesto	Condición	Punto de tiempo (semanas)	Impurezas totales (%)	Ensayo (%)	Potencia quiral (%)
AM (HS) 1	NA	0	1.10	79.5	99.6
AM (HS) 1	40 °C/75 % HR	5	1.16	80.3	99.6
Forma cristalina (I-HS)	NA	0	0.14	79.4	99.6
Forma cristalina (I-HS)	40 °C/75 % HR	5	0.07	79.6	99.6

Tabla 29. Datos de HPLC: Porcentaje de área pico por RRT de muestras de estabilidad

Muestra	Condición	Punto de tiempo (semanas)	TRR				
			0.793	0.863	0.981	1.000	1.535
AM (HS) 1	NA	0	0.00	0.98	0.12	98.89	0.00
			0.00	1.04	0.12	98.83	0.00
Forma cristalina (I-HS)	NA	0	0.07	0.00	0.00	99.86	0.07
			0.07	0.00	0.00	99.93	0.00

Conclusiones de estabilidad

El compuesto amorfó AM(HS)1 no era estable bajo condiciones de humedad y tenía tendencia a cristalizarse durante un período de tiempo. Esto se evidenció por la delicuencia de las muestras dejadas en cámaras de humedad y el cambio de apariencia tanto a simple vista como al microscopio de luz polarizada (datos no mostrados). El material amorfó pasa

- 5 de ser un polvo amarillo que fluye libremente a un polvo naranja aglomerado que no fluye libremente. La microscopía de luz polarizada, XRPD, DSC, TGA y KF del API amorfó también cambió significativamente en el transcurso del estudio de estabilidad acelerada para convertirse en la misma forma polimórfica que la forma cristalina (I-HS). El patrón de XRPD del compuesto amorfó AM(HS)1 se transformó en el patrón de XRPD de forma cristalina (I-HS) en el transcurso del estudio de estabilidad acelerada. La microscopía de luz polarizada pasó de no birefringente a birefringente bajo luz polarizada cruzada, lo que indica un cambio de API amorfó a cristalino. El DSC en t = 0 tiene dos eventos endotérmicos con máximos de fusión a 68.3 °C y 152.8 °C que desaparecen en el punto de tiempo de t = 5 semanas. Solo queda un único evento endotérmico para el material amorfó con un máximo de fusión a 206 °C. Este máximo de fusión coincide con el perfil termográfico del API cristalino. El perfil TGA del material amorfó en t = 5 semanas también cambió para coincidir con el perfil y la pérdida de peso del API cristalino. La forma cristalina (I-HS)
- 10 15 no mostró hidroscopicidad ni cambio de color, morfología o cristalinidad después del almacenamiento bajo condiciones aceleradas.

La pureza química del API no cambió significativamente durante el transcurso del estudio de estabilidad para AM(HS)1 o forma cristalina (I-HS). Los perfiles de impurezas de la forma amorfá y cristalina (I-HS) son, sin embargo, significativamente diferentes. El material amorfó contiene niveles significativamente más altos de impurezas (Tablas 22 y 23) en comparación con la forma cristalina (I-HS). Se cree que las impurezas reducidas en la forma cristalina (I-HS) frente a la AM(HS)1 amorfá a tiempos de retención relativos (RRT) de 0.863 (0.00 % frente a 0.98 %) y 1.535 (0.00 % frente a 0.12 %) se deben al aislamiento de la forma cristalina (I-HS) a través de un proceso de cristalización que rechaza estas impurezas y es superior al método de aislamiento para el AM(HS)1 amorfó. El proceso de aislamiento de AM(HS)1 amorfó no parece rechazar estas impurezas tan eficientemente.

Resumen general del estudio

1. La forma cristalina (I-HS) tiene mejores propiedades de flujo frente a la forma amorfá AM(HS). Las diferencias en las propiedades de flujo mejorarán el desarrollo de una forma cristalina sólida de dosificación oral (I-HS) frente a la AM (HS).

- 30 2. El estudio de estabilidad en una bolsa de LDPE a 40 °C/75 % de HR durante cinco semanas no mostró cambios significativos en los niveles de impurezas químicas para ninguna de las formas del compuesto. Sin embargo, reveló que la forma cristalina (I-HS) no tuvo un cambio significativo en sus propiedades fisicoquímicas durante el transcurso del estudio. Por el contrario, AM (HS), se convirtió en una forma cristalina sustancialmente similar a la forma cristalina (I-HS) por XRPD, DSC, TGA, KF y microscopía de luz polarizada. Además, AM(HS) cambió a un polvo aglomerado con propiedades de fluidez reducidas durante el transcurso de la prueba de estabilidad. Un cambio en las propiedades 35 40 del AM(HS) amorfó a un material cristalino y/o un polvo aglomerado con capacidad de flujo reducida durante el almacenamiento del AM(HS) haría imposible fabricar una forma de dosificación oral sólida para uso del paciente basada en el compuesto amorfó.

3. AM(HS) se delició cuando se expuso a la humedad. Esto requeriría precauciones de manejo significativas durante el almacenamiento y la fabricación para evitar que esto ocurra, mientras que la forma cristalina (I-HS) no requiere tales precauciones durante la fabricación de la forma cristalina (I-HS) y cualquier producto sólido de dosificación oral preparado utilizando la forma cristalina (I-HS).

4. La forma cristalina (I-HS) proporciona un perfil de impurezas significativamente mejorado en comparación con AM (HS). La capacidad de controlar un perfil de impurezas es importante para la seguridad del paciente y lo requieren las Agencias Reguladoras.

Ejemplo 11

La forma cristalina (I-HS) disminuye el crecimiento de tumores caracterizados por expresar una proteína de fusión Trk

Se realizó un conjunto de experimentos para determinar si la forma cristalina (I-HS) inhibiría el crecimiento de tres tumores xenográficos (humanos) diferentes en ratones, con cada tumor xenográfico derivado de una línea celular cancerosa. Las tres líneas celulares de cáncer diferentes, la línea celular CUTO-3F, la línea celular KM12 y la línea celular MO-91, expresan cada una una fusión del gen Trk diferente. Como se describe en el Ejemplo 7, la línea celular CUTO-3F se deriva de un paciente con adenocarcinoma de pulmón que alberga la fusión del gen MPRIP-NTRK1, la línea celular KM12 es una línea celular de cáncer colorrectal que alberga la fusión TPM3-NTRK1 (Vaishnavi et al., Nature Med. 19:1469-1472, 2013), y la línea celular MO-91 se deriva de un paciente con leucemia mieloide aguda que alberga la fusión ETV6-NTRK3 (Taipale et al., Nature Biotech. 31:630-637, 2013). Después de la implantación de uno de estos tres tumores xenográficos (humanos) diferentes en ratones, se controló el cambio en el volumen de cada tumor. Los ratones resultantes se dejaron tratados con vehículo o se les administró por vía oral una dosis diaria de 60 mg/kg o 200 mg/kg de forma cristalina (I-HS) (Figuras 45-47, respectivamente) después de la implantación del xenoinjerto.

Estos datos muestran que la administración de la forma cristalina (I-HS) es capaz de detener eficazmente el crecimiento, o disminuir la tasa de crecimiento, de tumores humanos caracterizados por la expresión de una proteína de fusión Trk oncogénica en un mamífero.

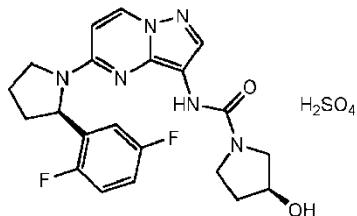
5 Si bien la especificación anterior enseña los principios de la presente invención, con ejemplos proporcionados con fines ilustrativos, se entenderá que la práctica de la invención abarca todas las variaciones, adaptaciones y/o modificaciones habituales que entran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Referencias:

1. Wiesner et al., Nature Comm. 5:3116, 2014.
2. Vaishnavi et al., Nature Med. 19:1469-1472, 2013.
- 10 3. Greco et al., Mol. Cell. Endocrinol. 28:321, 2010.
4. Kim et al., PloS ONE 9(3):e91940, 2014.
5. Vaishnavi et al., Nature Med. 19:1469-1472, 2013.
6. Fernandez-Cuesta et al., "Cross-entity mutation analysis of lung neuroendocrine tumors sheds light into their molecular origin and identifies new therapeutic targets," AACR Annual Meeting 2014, Abstract, April 2014.
- 15 7. Stransky et al., Nature Comm. 5:4846, 2014.
8. Ross et al., Oncologist 19:235-242, 2014.
9. Doebele et al., J. Clin. Oncol. 32:5s, 2014.
10. Jones et al., Nature Genetics 45:927-932, 2013.
11. Wu et al., Nature Genetics 46:444-450, 2014.
- 20 12. WO 2013/059740
13. Zheng et al., "Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing," Nature Med., published online on November 10, 2014.
14. Caria et al., Cancer Genet. Cytogenet. 203:21-29, 2010.
15. Frattini et al., Nature Genet. 45:1141-1149, 2013.
- 25 16. Martin-Zanca et al., Nature 319:743, 1986.
17. Meyer et al., Leukemia 21: 2171-2180, 2007.
18. Reuther et al., Mol. Cell. Biol. 20:8655-8666, 2000.
19. Marchetti et al., Human Mutation 29(5):609-616, 2008.
20. Tacconelli et al., Cancer Cell 6:347, 2004.
- 30 21. Walch et al., Clin. Exp. Metastasis 17: 307-314, 1999.
22. Papatsoris et al., Expert Opin. Invest. Drugs 16(3):303-309, 2007.
23. Van Noesel et al., Gene 325: 1-15, 2004.
24. Zhang et al., Oncology Reports 14: 161-171, 2005.
25. Truzzi et al., J. Invest. Dermatol. 128(8):2031, 2008.
- 35 26. Kolokythas et al., J. Oral Maxillofacial Surgery 68(6):1290-1295, 2010.
27. Ni et al., Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 13:1511, 2012.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina (I-HS) que tiene la fórmula:

**I-HS**

- 5 caracterizada porque tiene picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 18.4 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 , en la que la forma cristalina está sustancialmente libre de otras formas amorphas, polimórficas o cristalinas, lo que significa que el porcentaje molar de otras formas amorphas, polimórficas o cristalinas de la base aislada de la forma cristalina (I-HS) es menos de aproximadamente 5 por ciento en moles.
- 10 2. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 .
- 15 3. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 20.2 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 21.5 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 y 24.0 ± 0.2 .
- 20 4. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque tiene picos de difracción de XRPD (2θ grados) a 10.7 ± 0.2 , 15.3 ± 0.2 , 16.5 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 19.9 ± 0.2 , 20.2 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , 21.5 ± 0.2 , 22.1 ± 0.2 , 23.1 ± 0.2 , 24.0 ± 0.2 , 24.4 ± 0.2 , 25.6 ± 0.2 , 26.5 ± 0.2 , 27.6 ± 0.2 , 28.2 ± 0.2 , 28.7 ± 0.2 , 30.8 ± 0.2 y 38.5 ± 0.2 .
- 25 5. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la forma cristalina exhibe un inicio hasta un máximo de aproximadamente 193 hasta aproximadamente 205°Celsius, medido por calorimetría diferencial de barrido.
- 30 6. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la forma cristalina presenta un calor de fusión de aproximadamente 2.415 mW, medido por calorimetría diferencial de barrido.
- 35 7. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la forma cristalina no es higroscópica.
- 40 8. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 45 9. Un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. Una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cáncer, dolor, inflamación, enfermedad neurodegenerativa o infección por Trypanosoma cruzi.
- 55 11. Una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de un cáncer mediado por una quinasa Trk.
- 60 12. La forma cristalina para uso de la reivindicación 11, en la que el cáncer está mediado por TrkA.
- 65 13. La forma cristalina para uso de la reivindicación 11, en la que el cáncer está mediado por TrkB.
- 70 14. La forma cristalina para uso de la reivindicación 11, en la que el cáncer está mediado por TrkA y TrkB.
- 75 15. Una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado o identificado como que tiene cáncer asociado a Trk.
- 80 16. Una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de un cáncer asociado con una o más de sobreexpresión, activación, amplificación y mutación de una quinasa Trk, en la que el uso comprende primero determinar si el cáncer está asociado con una o más de sobreexpresión, activación, amplificación y mutación de una quinasa Trk.
- 85 17. Una forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o el nivel de los mismos.

18. La forma cristalina para uso de la reivindicación 15 o 17, en la que la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o el nivel del mismo es una traducción cromosómica que da como resultado la traducción de una proteína de fusión Trk.

5 19. La forma cristalina para uso de la reivindicación 18, en la que la proteína de fusión Trk se selecciona del grupo que consiste en: TP53-TrkA, LMNA-TrkA, CD74-TrkA, TFG-TrkA, TPM3-TrkA, NFASC-TrkA, BCAN-TrkA, MPRIP-TrkA, TPR-TrkA, RFWD2-TrkA, IRF2BP2-TrkA, SQSTM1-TrkA, SSBP2-TrkA, RABGAP1L-TrkA, C18ORF8-TrkA, RNF213-TrkA, TBC1D22A-TrkA, C20ORF112-TrkA, DNER-TrkA, ARHGEF2-TrkA, CHTOP-TrkA, PPL-TrkA, PLEKHA6-TrkA, PEAR1-TrkA, MRPL24-TrkA, MDM4-TrkA, LRRC71-TrkA, GRIPAP1-TrkA, EPS15-TrkA, DYNC2H1-TrkA, CEL-TrkA, EPHB2-TrkA, TGF-TrkA, NACC2-TrkB, QKI-TrkB, AFAP1-TrkB, PAN3-TrkB, SQSTM1-TrkB, TRIM24-TrkB, VCL-TrkB, AGBL4-TrkB, DAB2IP-TrkB, ETV6-TrkC, BTBD1-TrkC, LYN-TrkC, RBPMS-TrkC, EML4-TrkC, HOMER2-TrkC, TFG-TrkC, FAT1-TrkC, y TEL-TrkC.

10 20. La forma cristalina para uso de la reivindicación 15 o 18, en la que la desregulación de un gen NTRK, una proteína Trk, o la expresión o actividad de los mismos es una o más mutaciones puntuales en el gen.

15 21. La forma cristalina para uso de la reivindicación 20, en la que el gen NTRK es un gen NTRK1, y la una o más mutaciones puntuales en el gen NTRK1 dan como resultado la traducción de una proteína TrkA que tiene sustituciones son una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos: 33, 336, 337, 324, 420, 444, 517, 538, 649, 682, 683, 702 y 1879.

20 22. La forma cristalina para uso de la reivindicación 21, en la que una o más mutaciones puntuales en el gen NTRK1 dan como resultado la traducción de una proteína TrkA que tiene una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: R33W, A336E, A337T, R324Q, R324W, V420M, R444Q, R444W, G517R, G517V, K538A, R649W, R649L, R682S, V683G, R702C y C1879T.

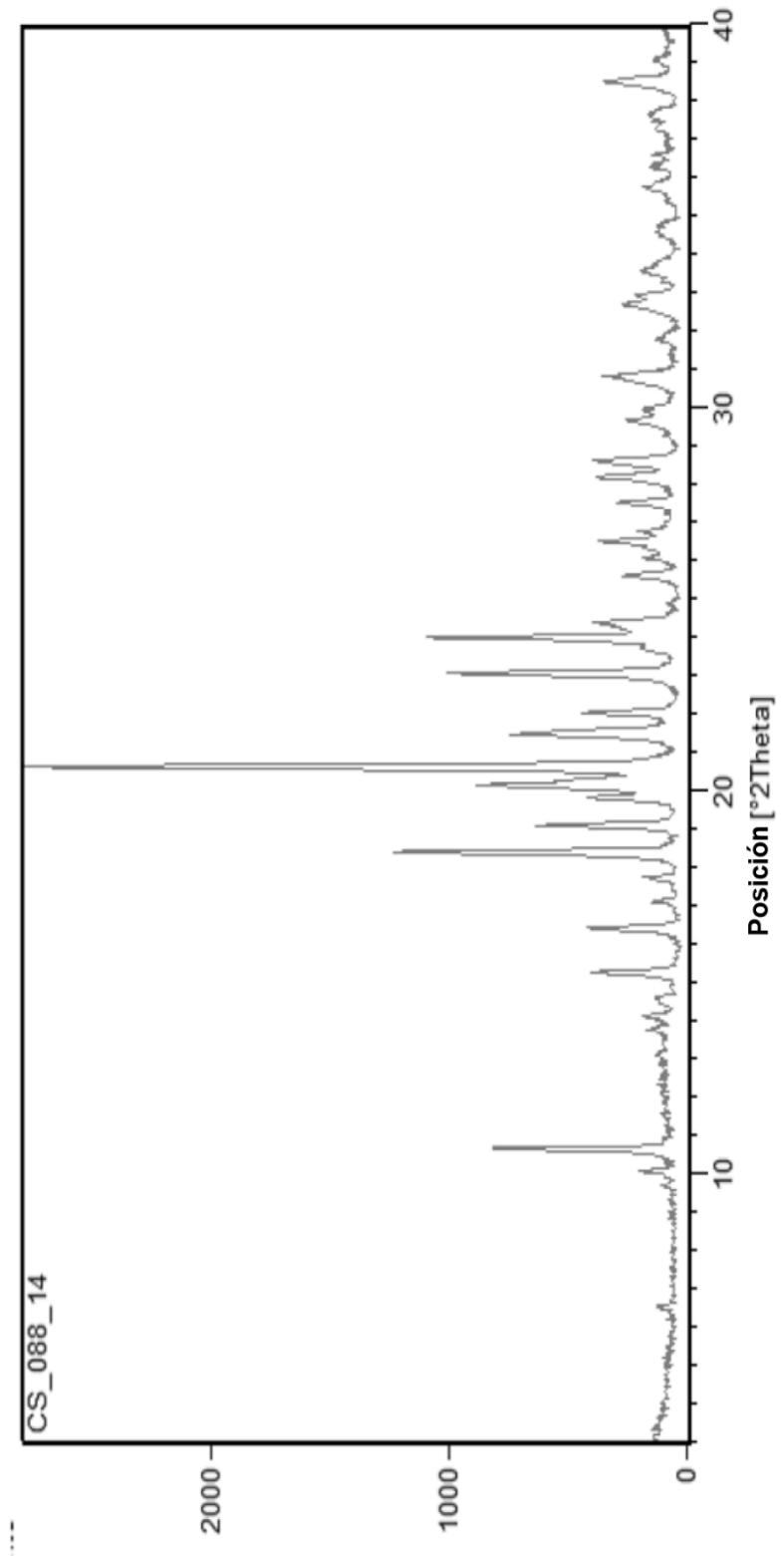


FIG. 1

ES 2 941 630 T3

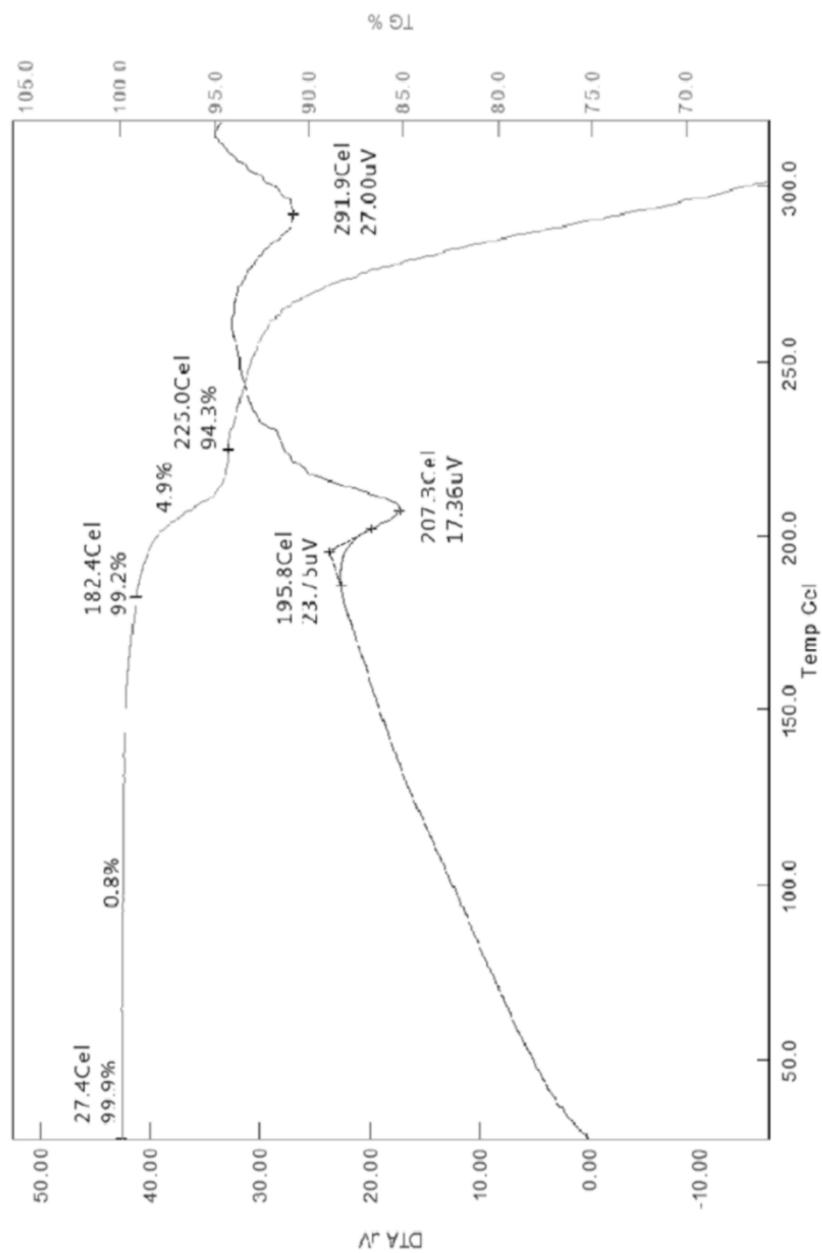


FIG. 2

ES 2 941 630 T3

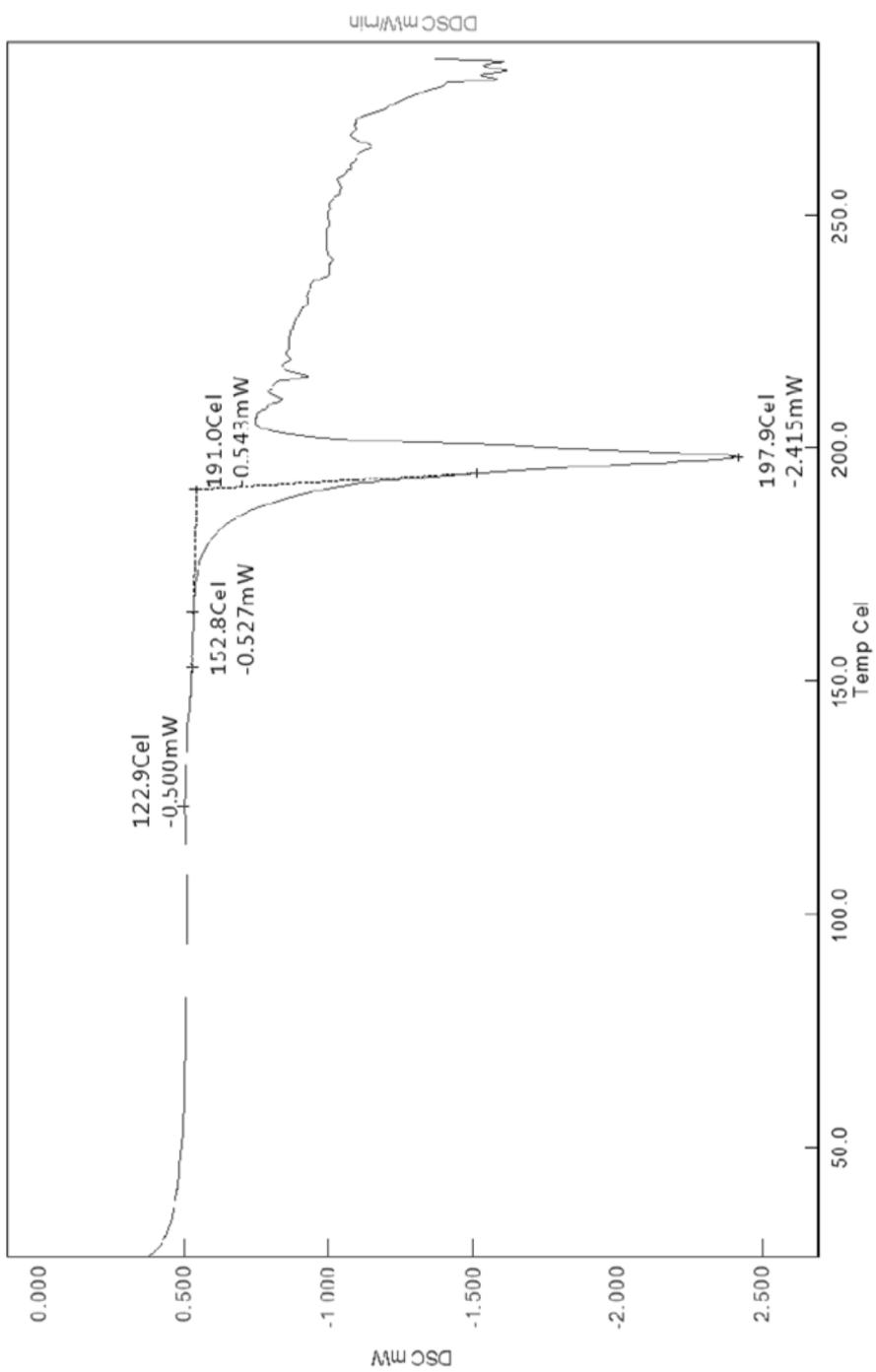
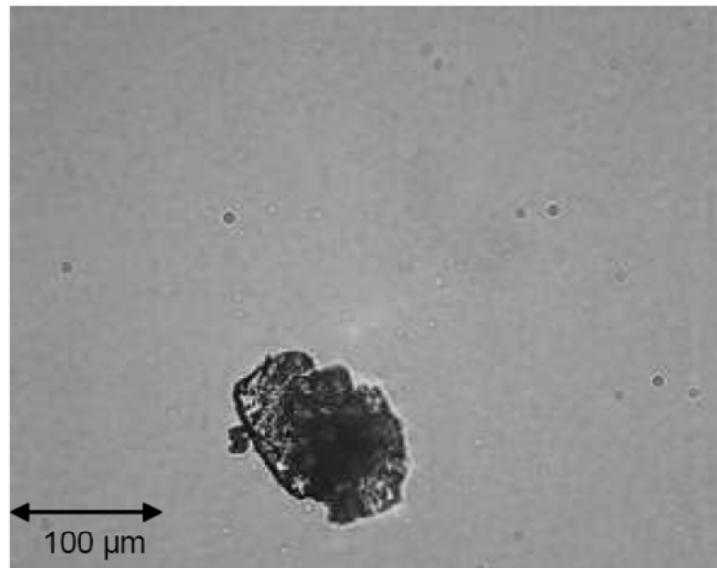
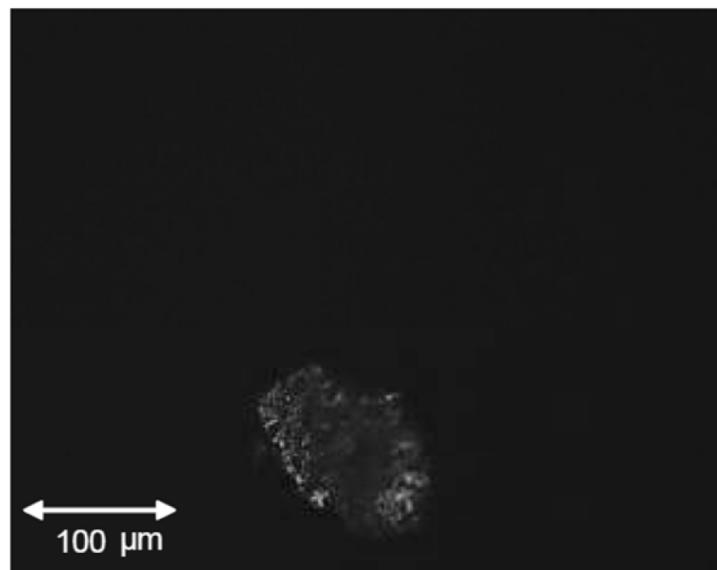


FIG. 3



Luz no polarizada

FIG. 4A



Luz polarizada

FIG. 4B

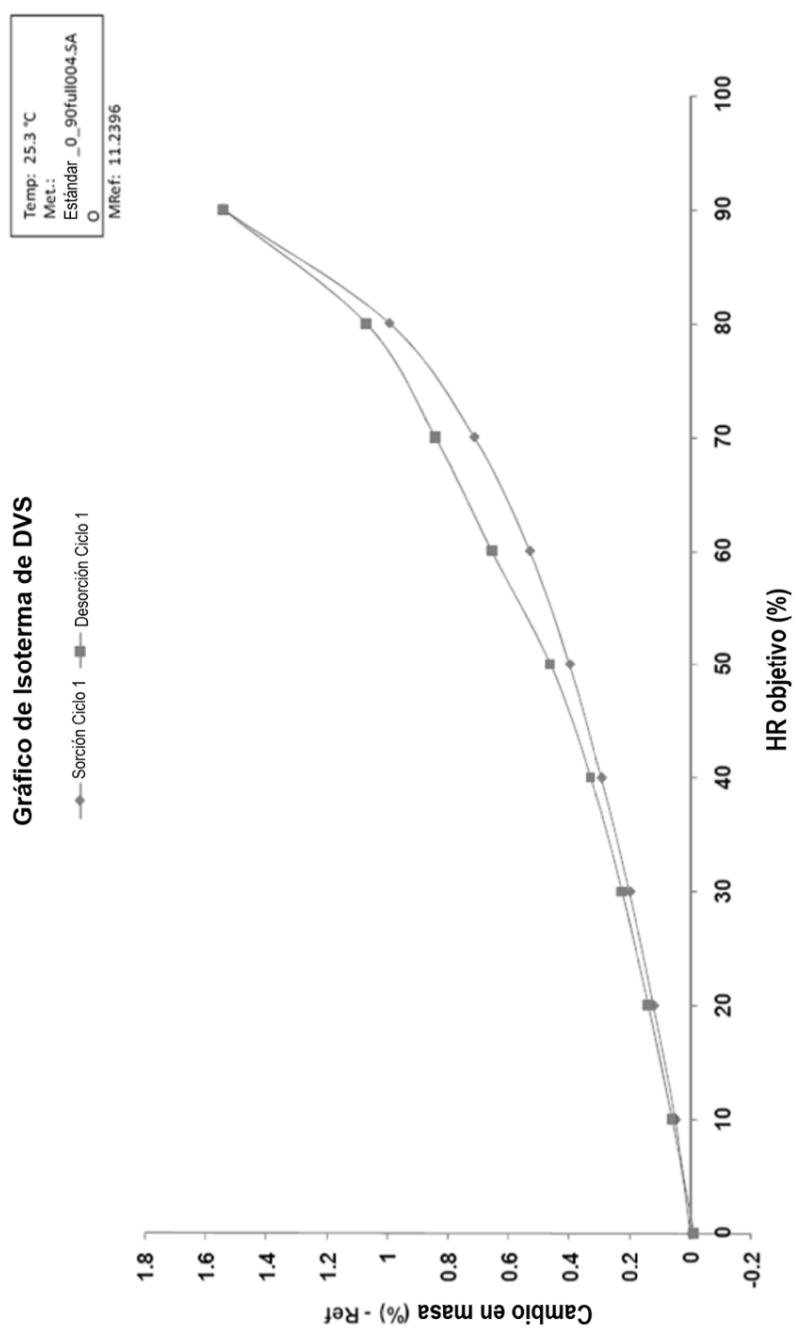


FIG. 5

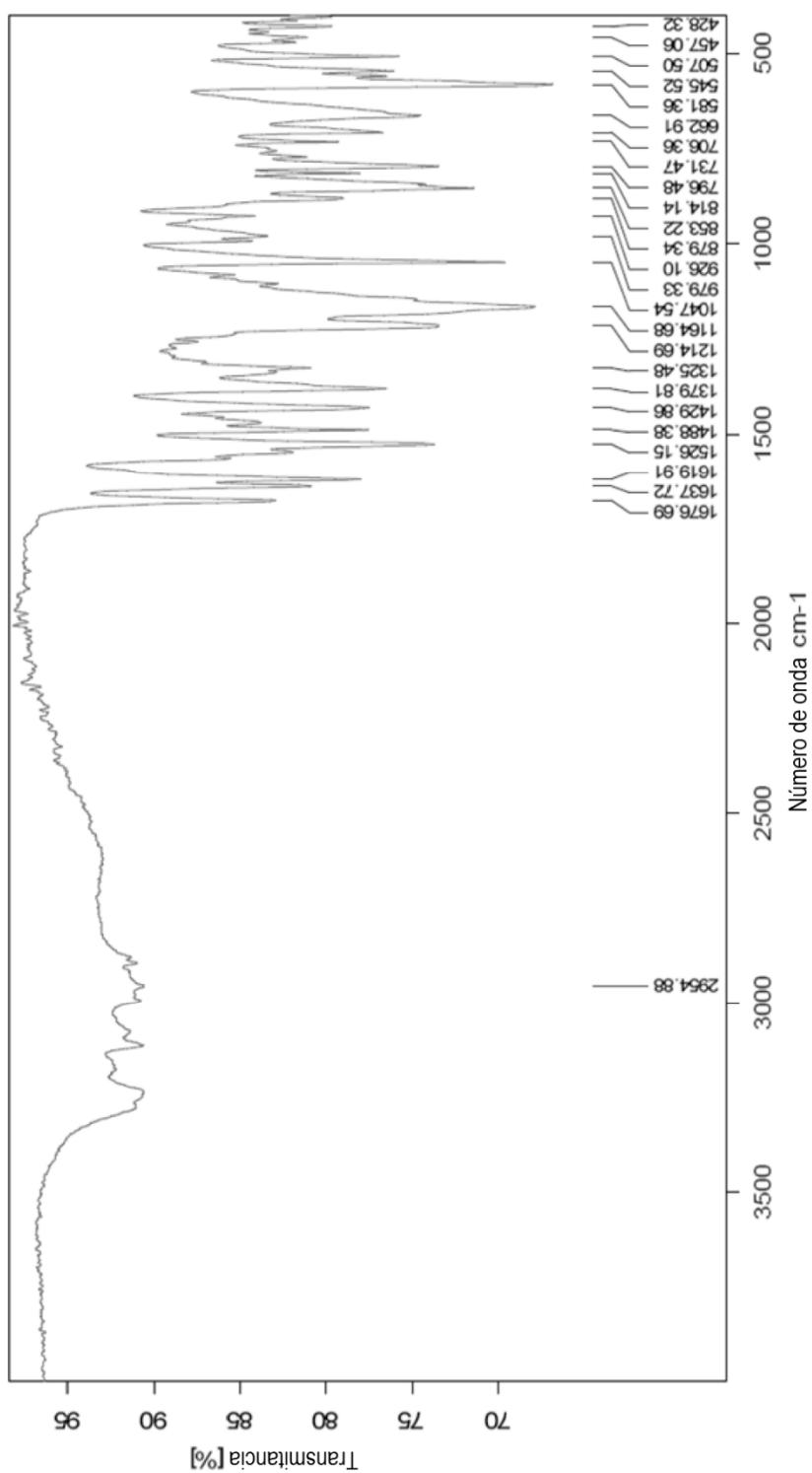


FIG. 6

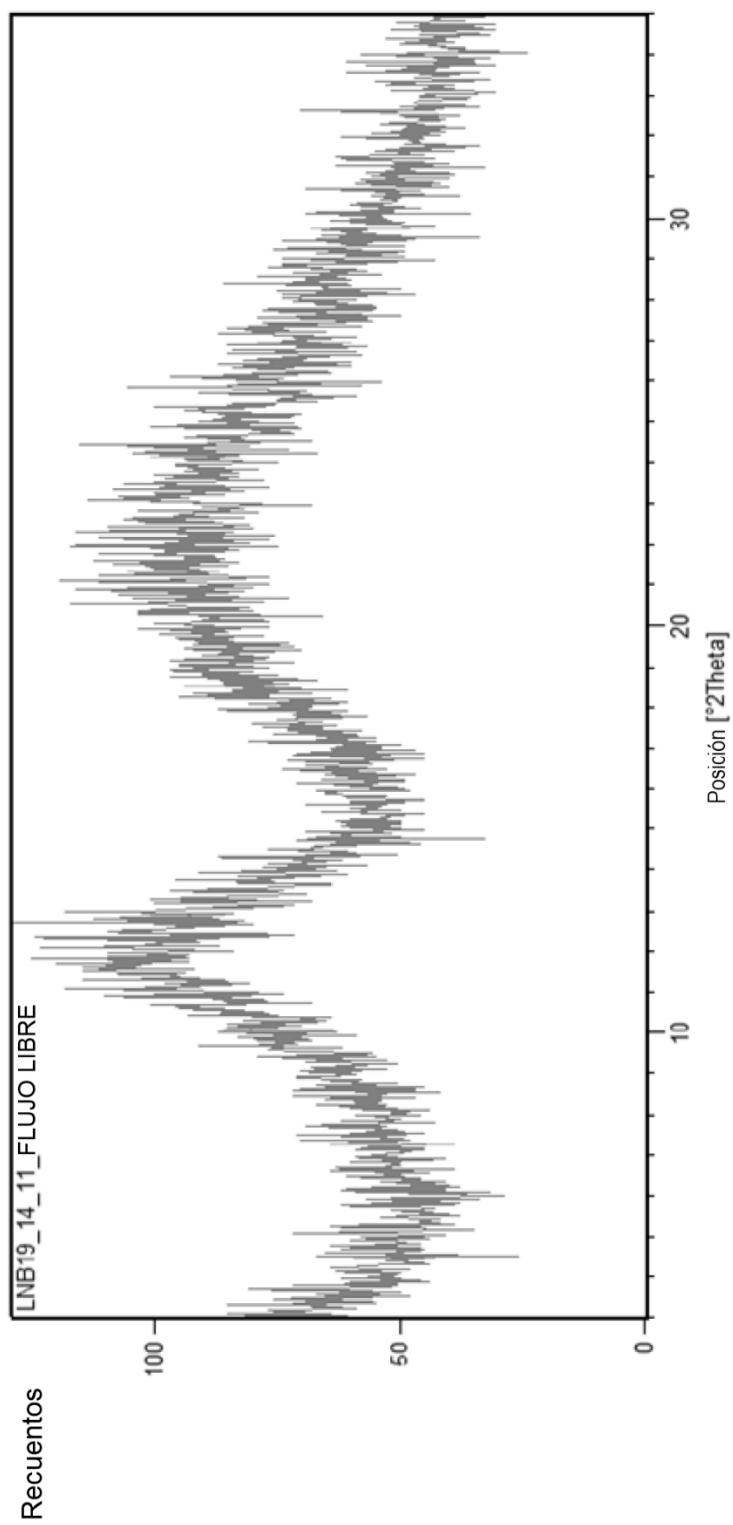


FIG. 7

Expediente de abogado No. 40449-0010P02

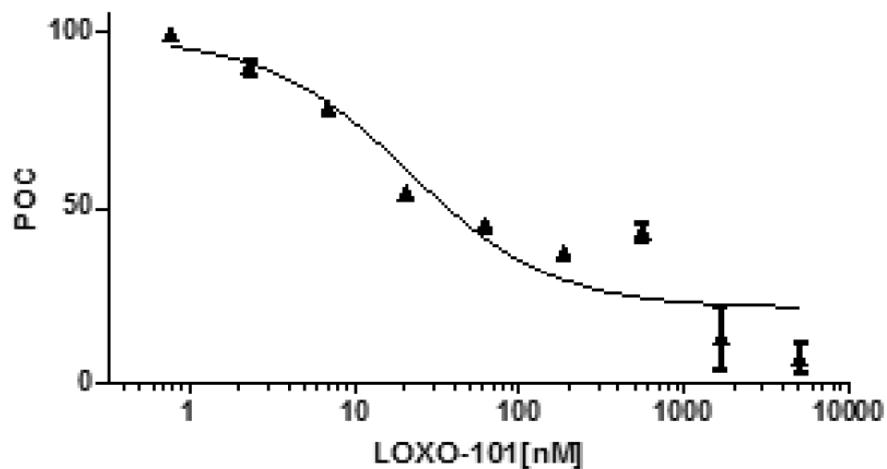


Figura 8

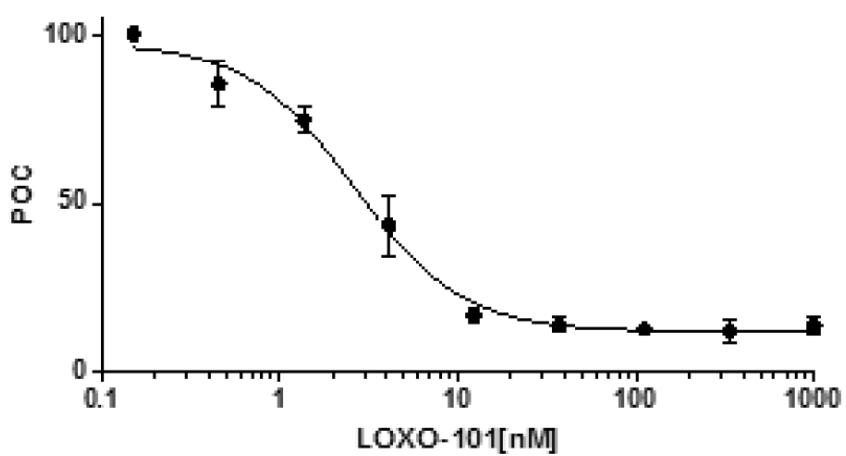


Figura 9

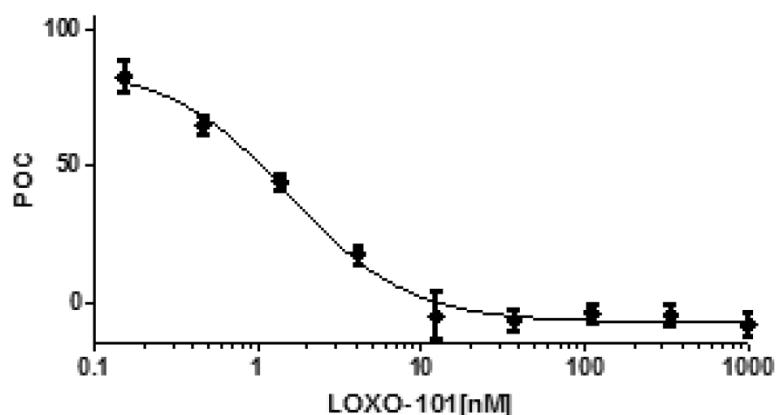


Figura 10

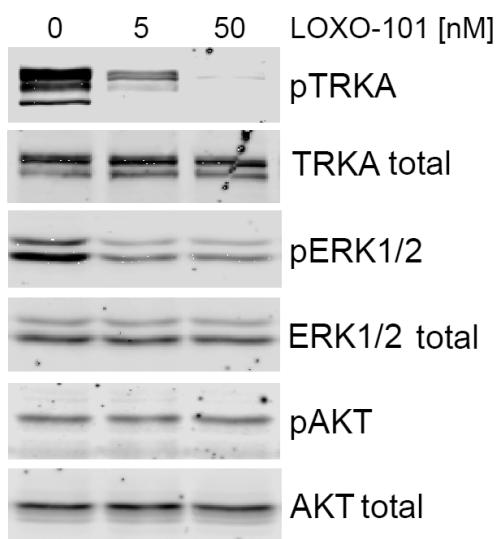


Figura 11

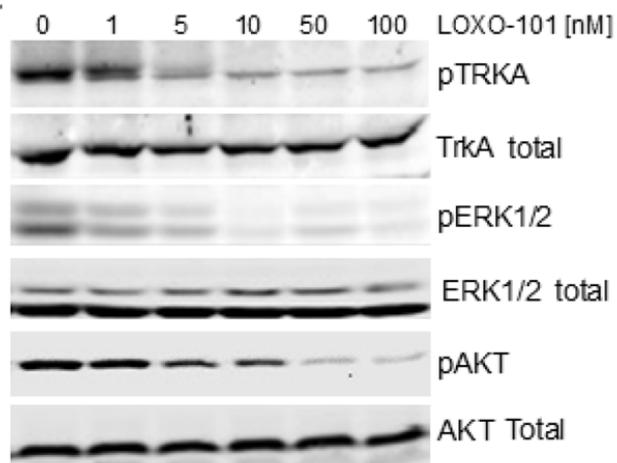


Figura 12

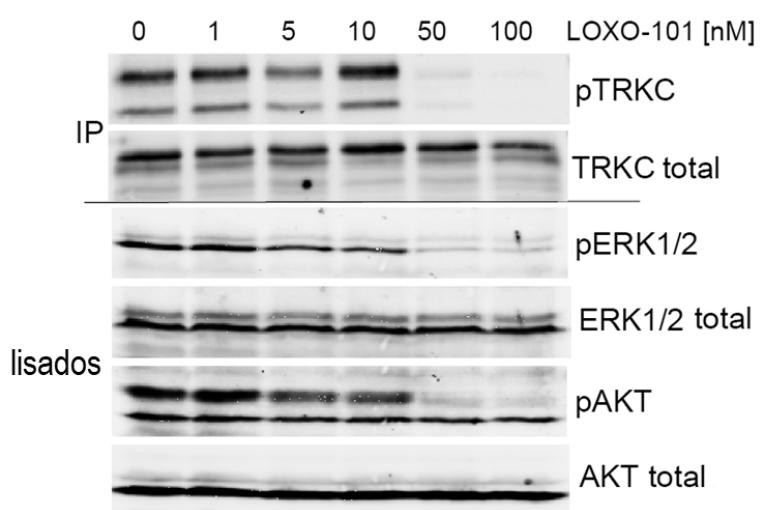


Figura 13

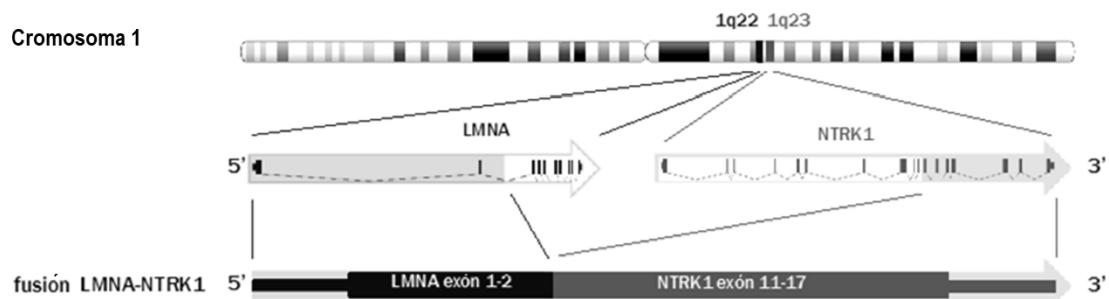


Figura 14

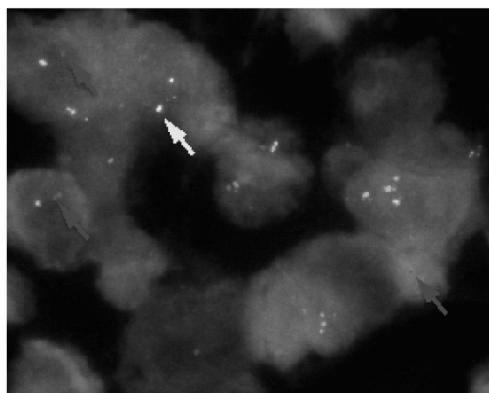


Figura 15

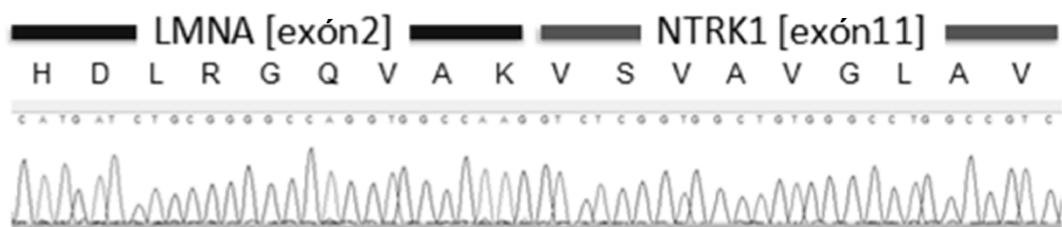


Figura 16

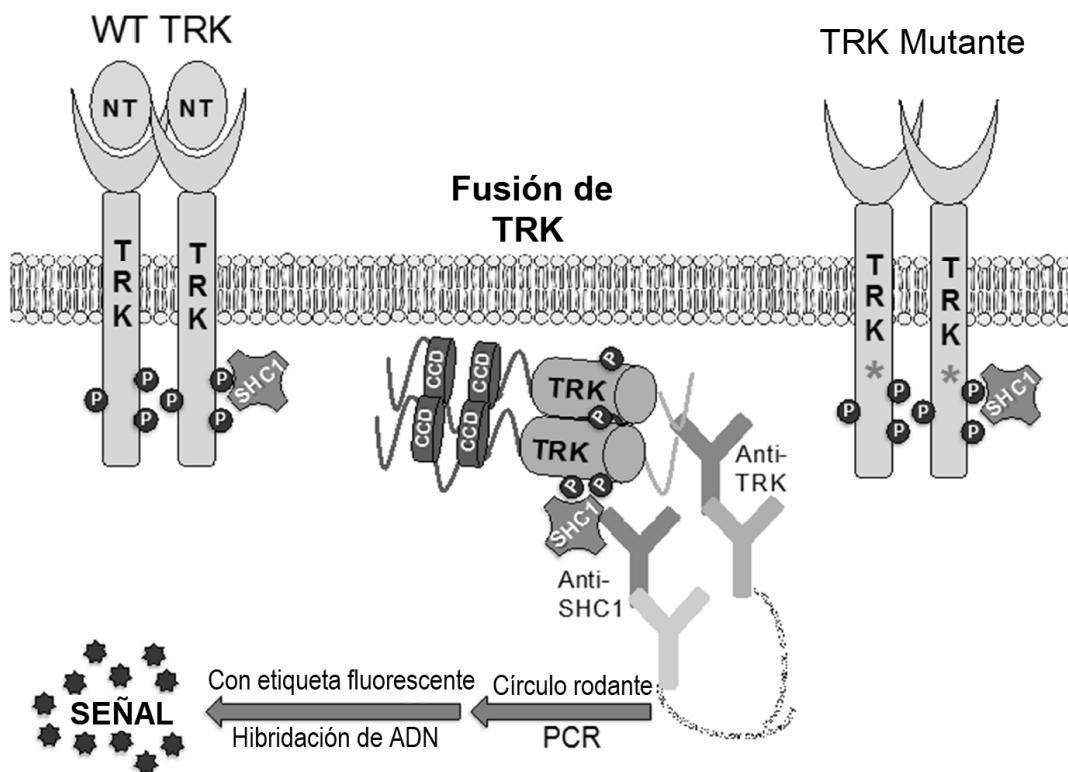


Figura 17

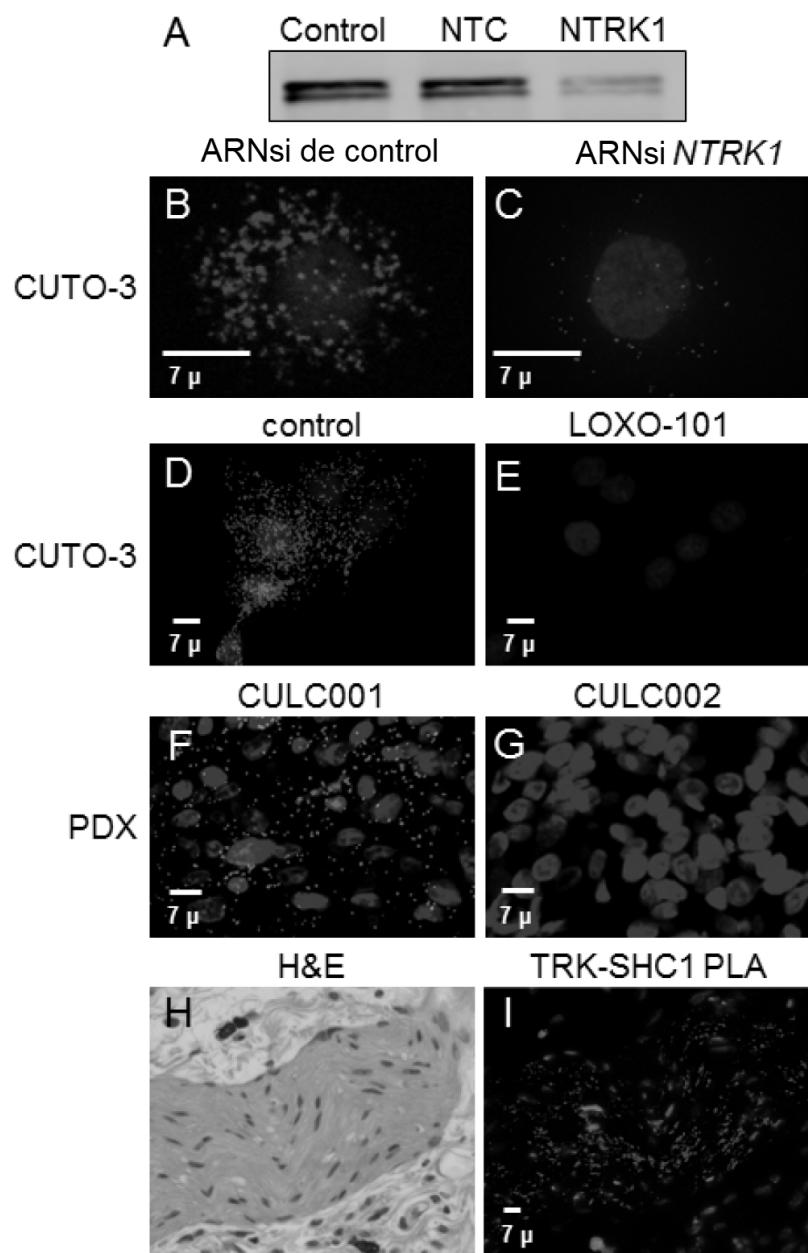
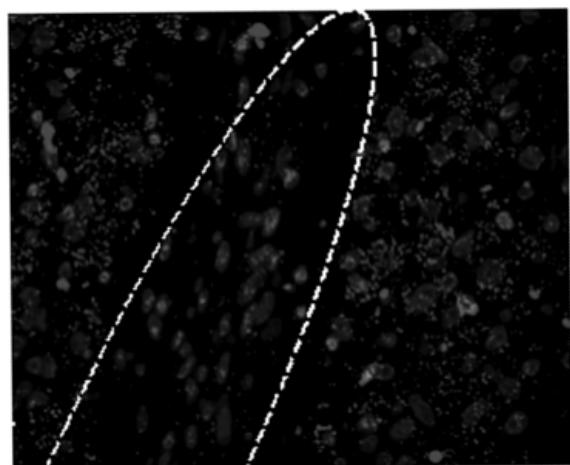


Figura 18

A



B

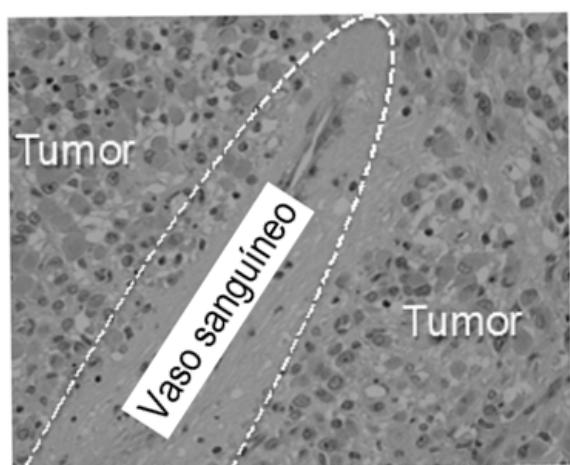
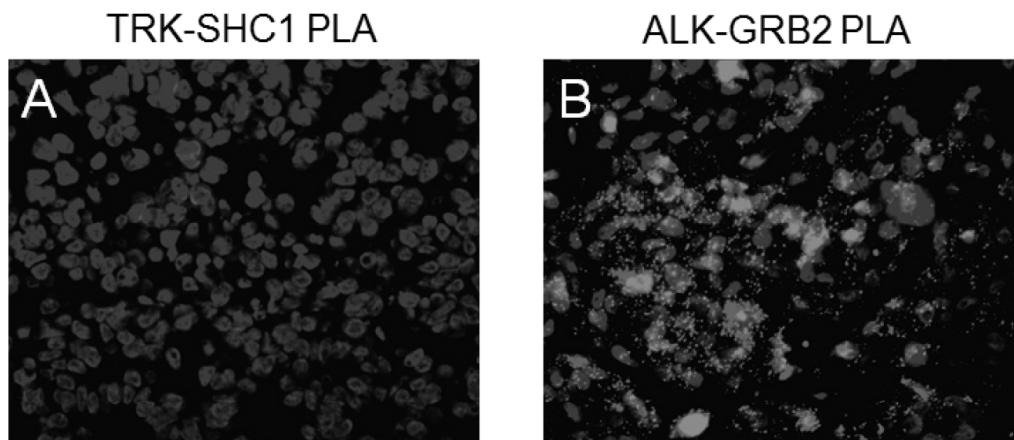


Figura 19

Expediente de abogado No. 40449-0010P02



ALK+ paciente con NSCLC

Figura 20

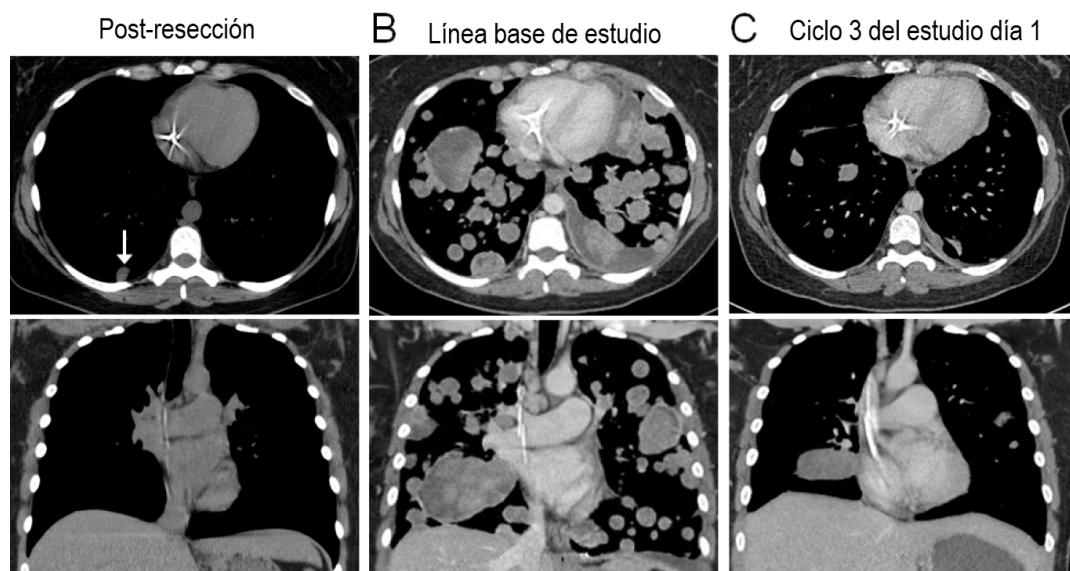


Figura 21

ES 2 941 630 T3

Expediente de abogado No. 40449-0010P02

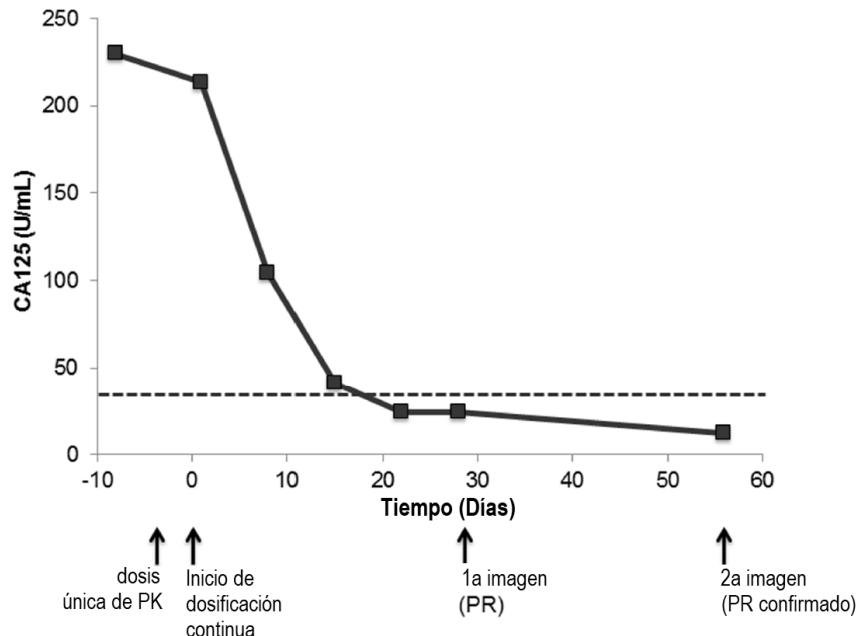


Figura 22

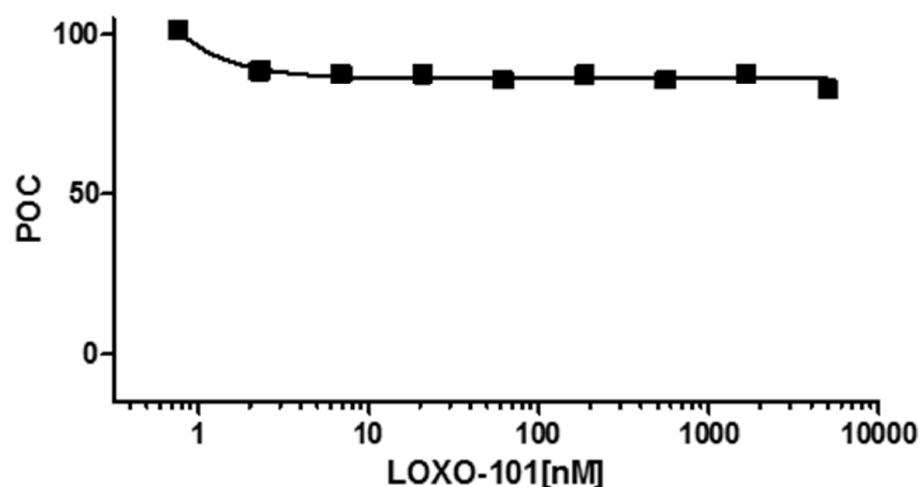


Figura 23

ES 2 941 630 T3

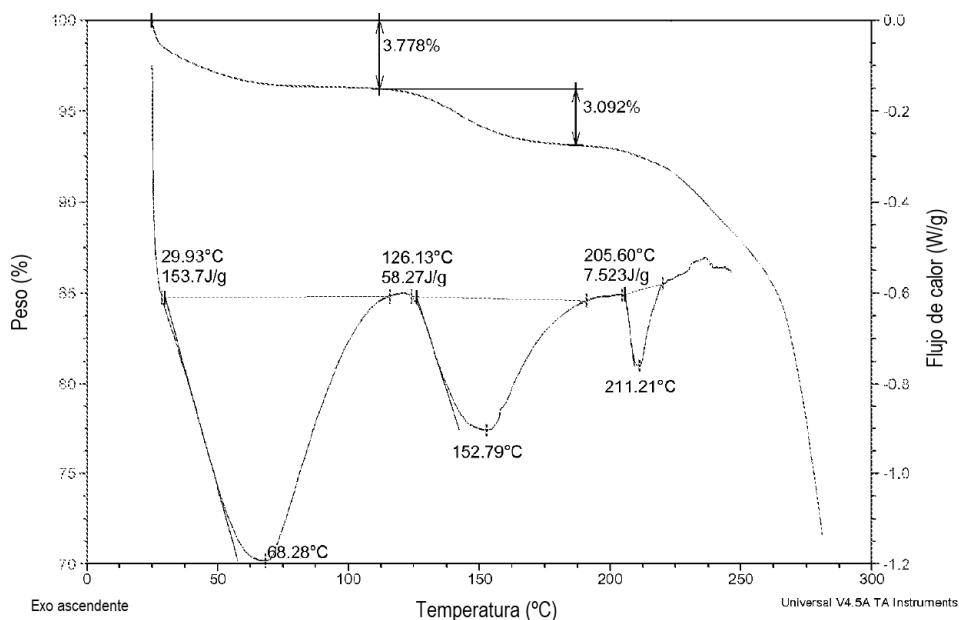


FIGURA 24

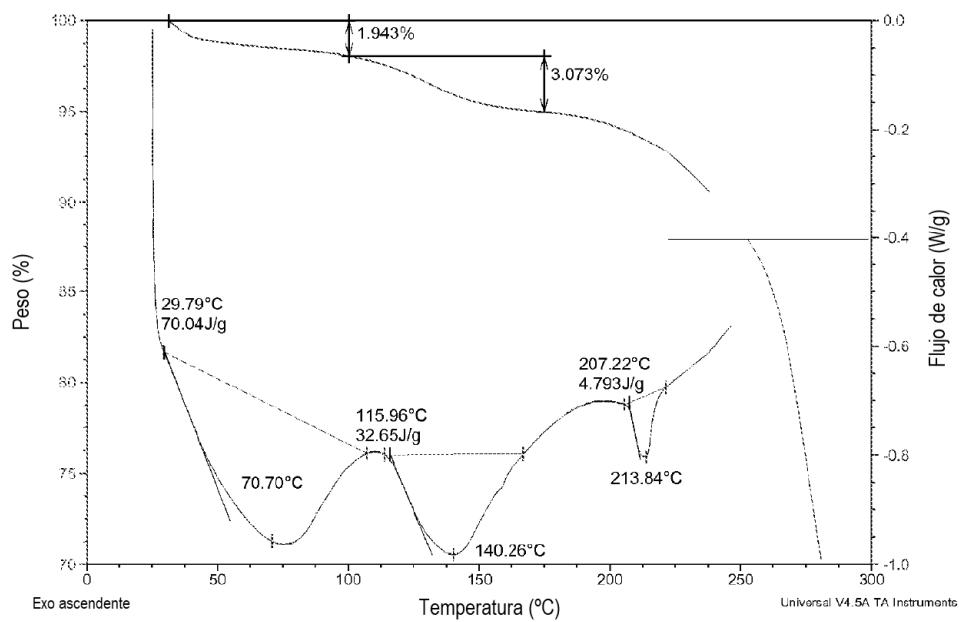


FIGURA 25

ES 2 941 630 T3

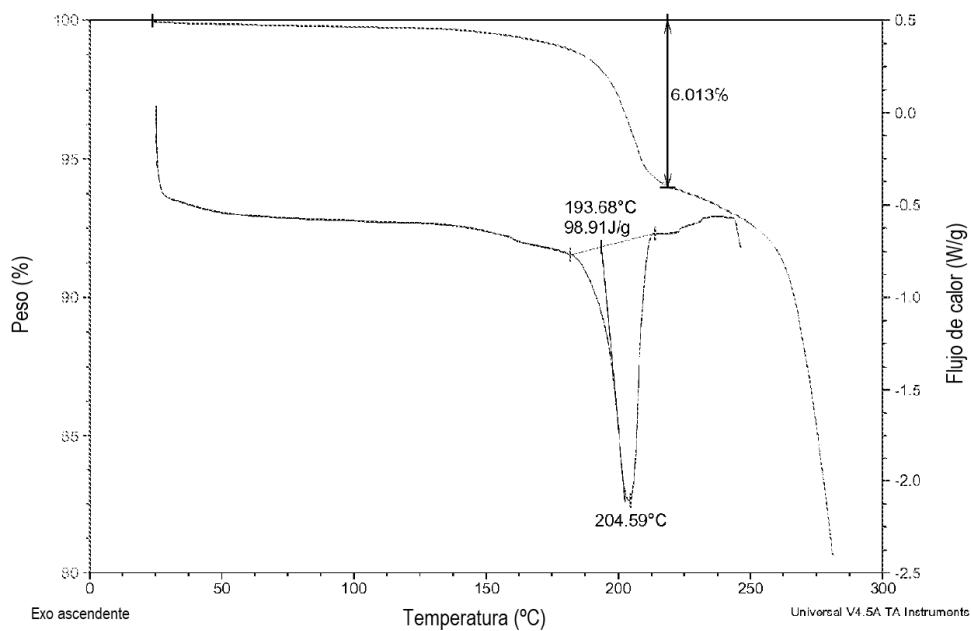


FIGURA 26

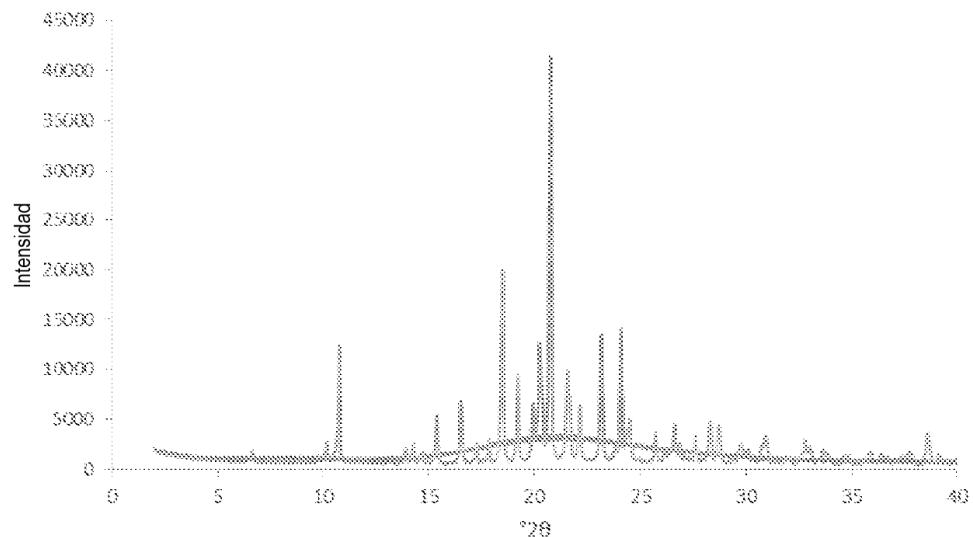


FIGURA 27

ES 2 941 630 T3

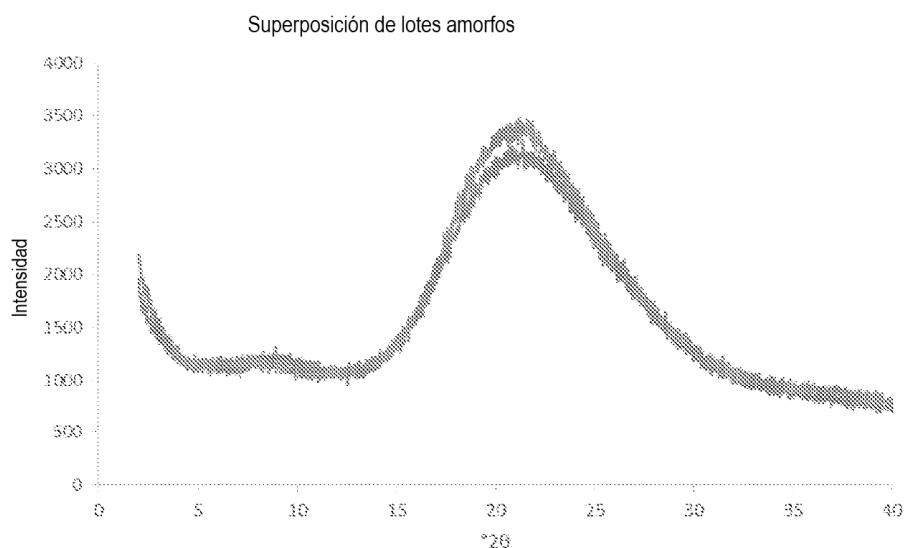


FIGURA 28

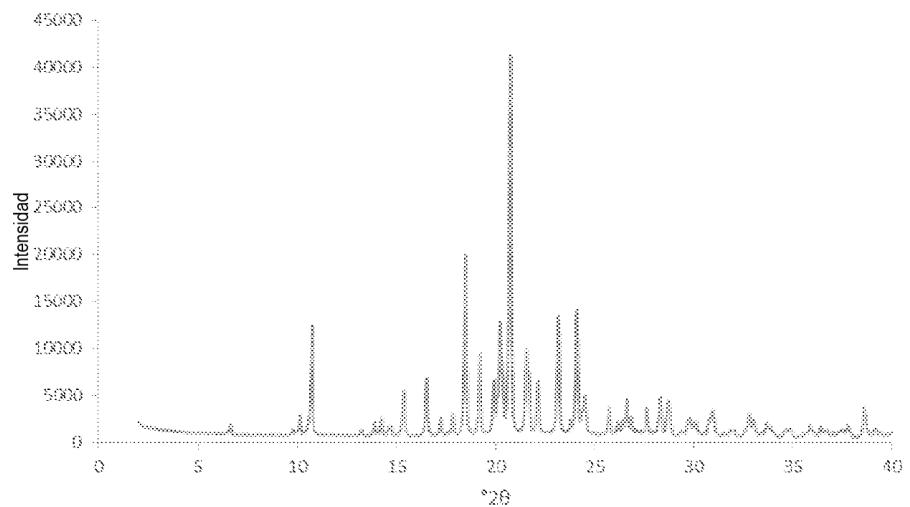


FIGURA 29

ES 2 941 630 T3

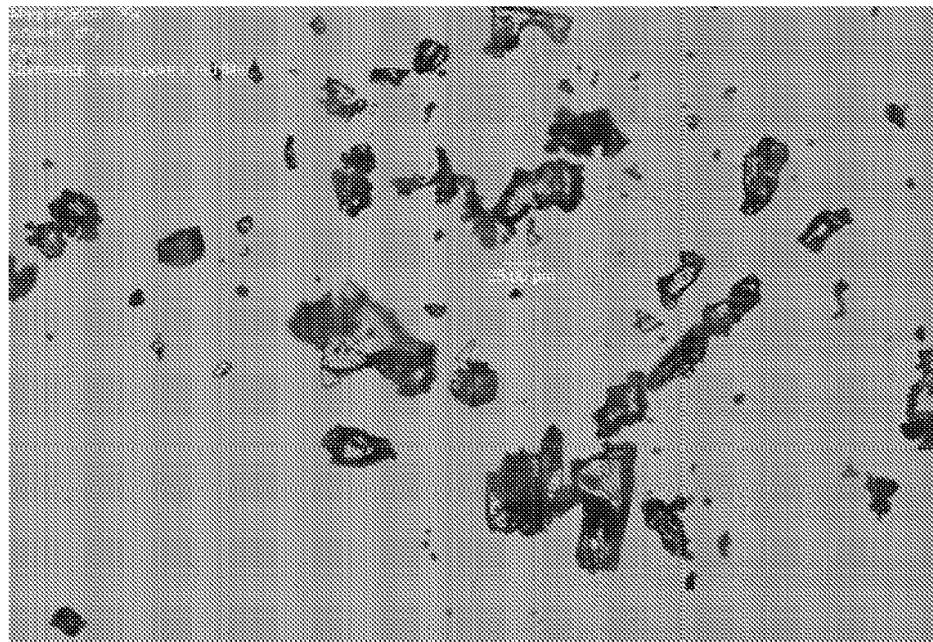


FIGURA 30

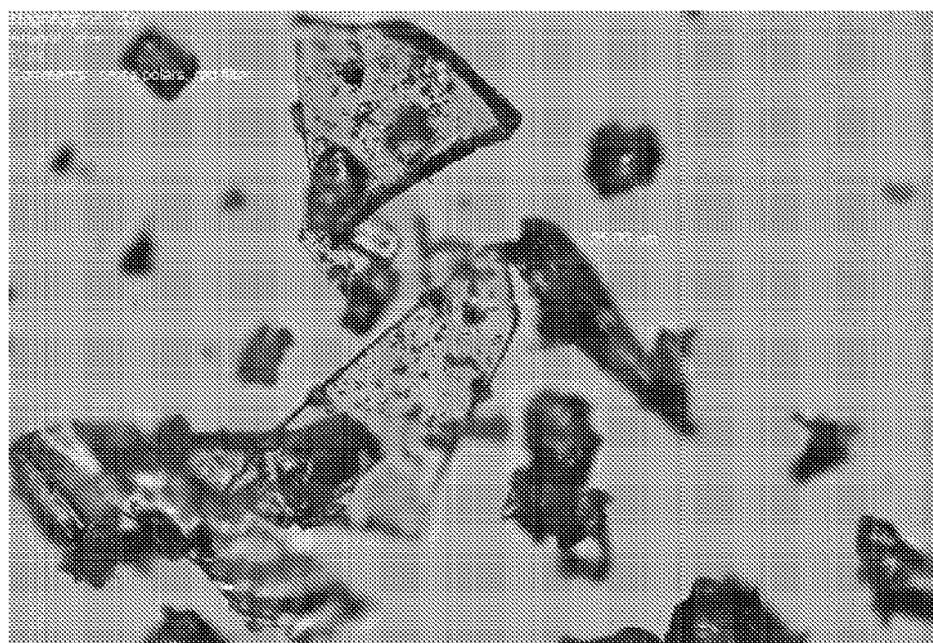


FIGURA 31

ES 2 941 630 T3

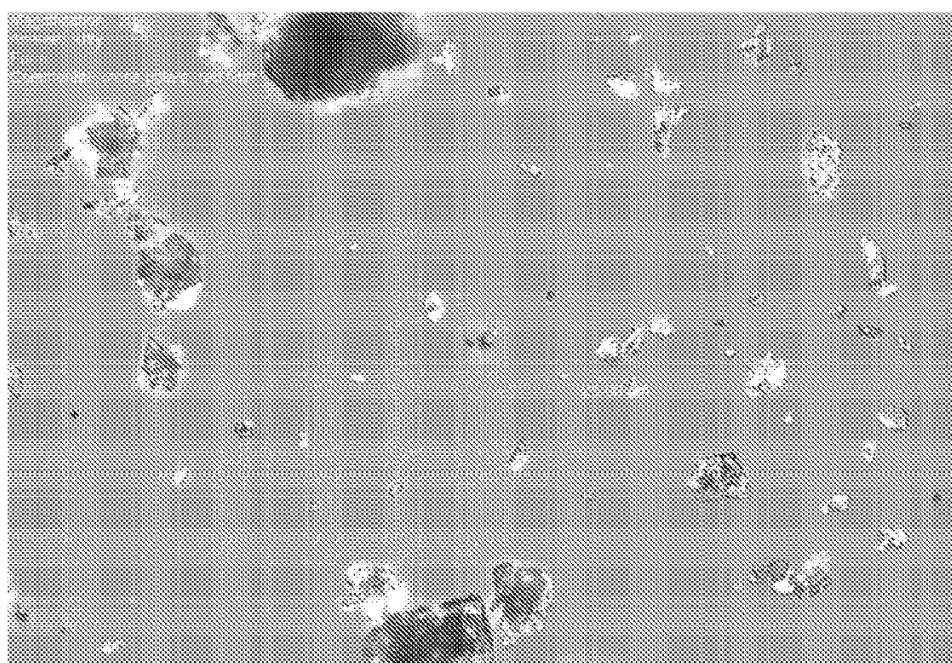


FIGURA 32

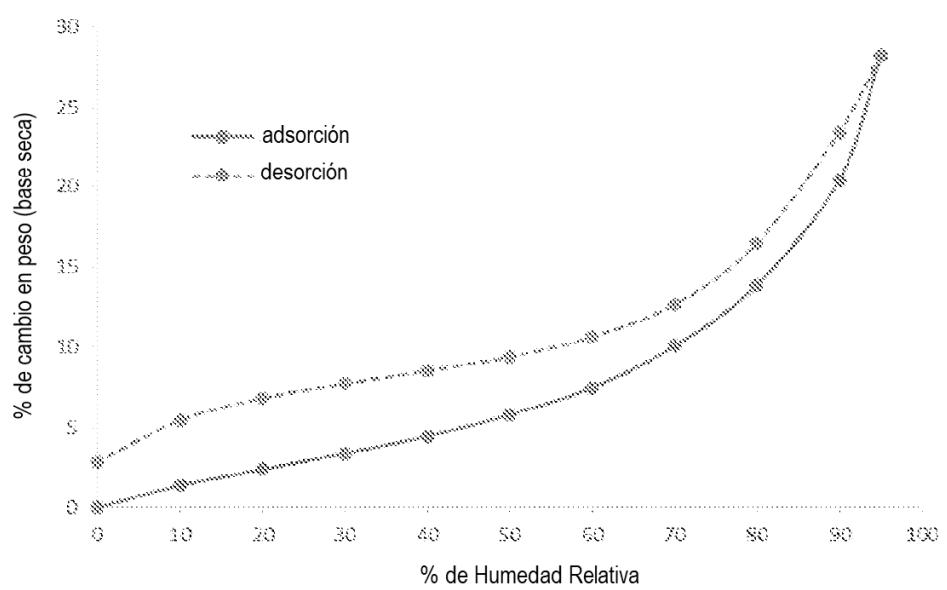


FIGURA 33

ES 2 941 630 T3

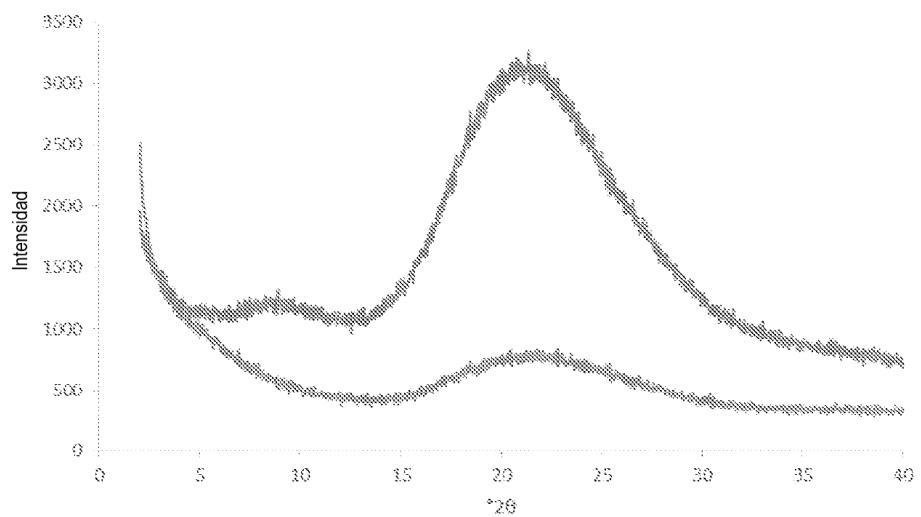


FIGURA 34

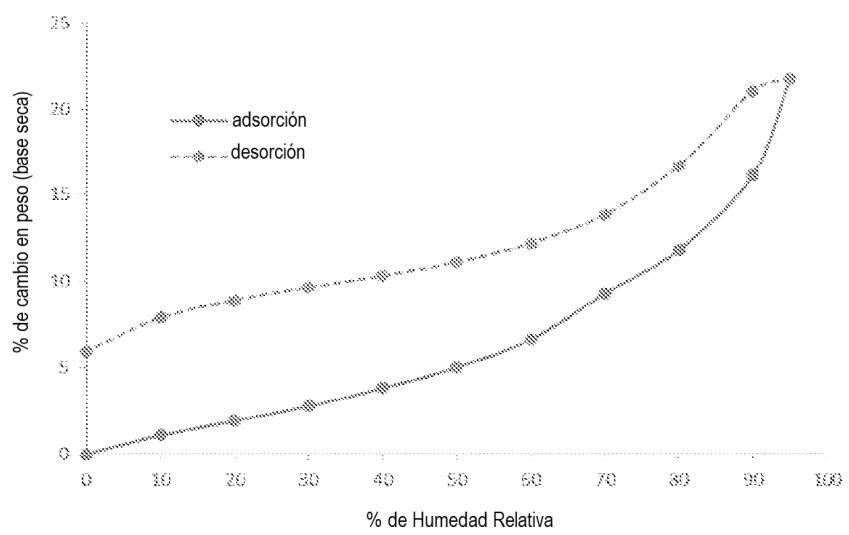


FIGURA 35

ES 2 941 630 T3

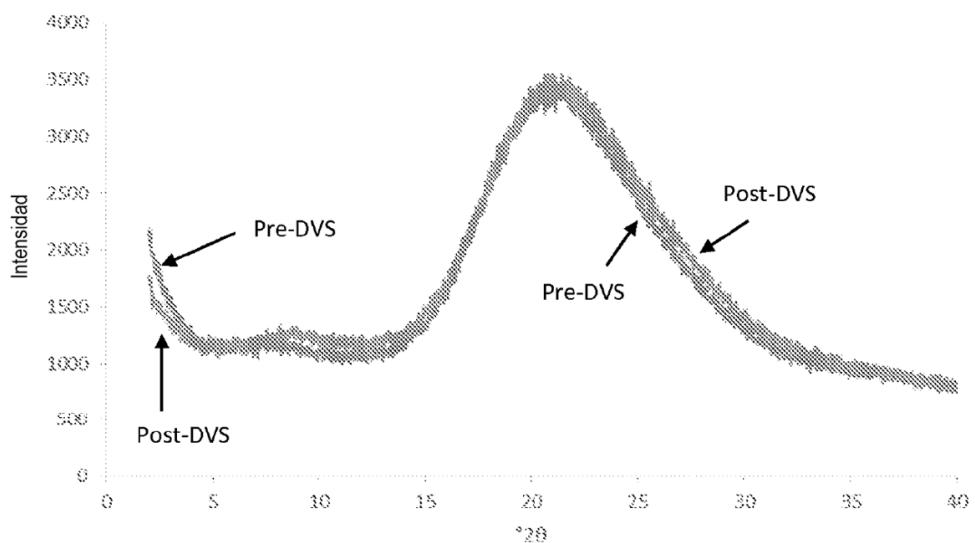


FIGURA 36

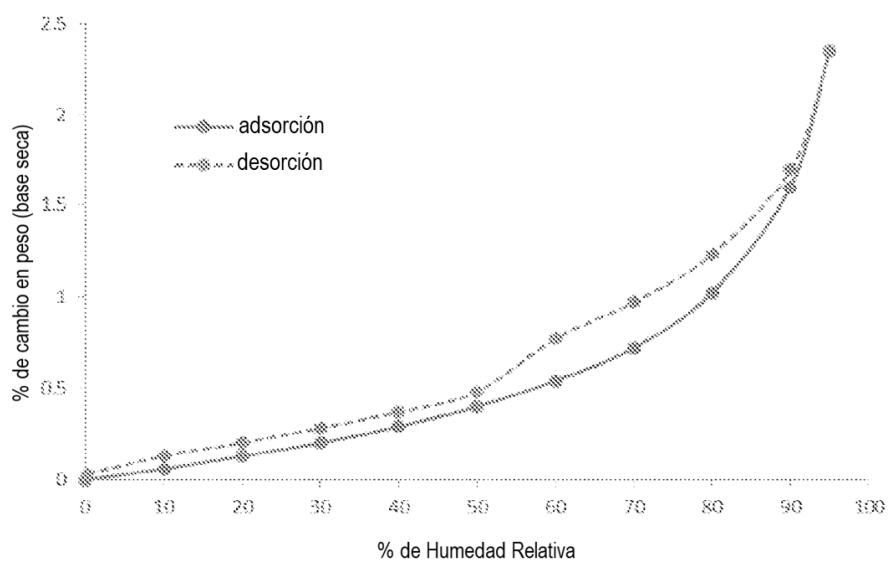


FIGURA 37

ES 2 941 630 T3

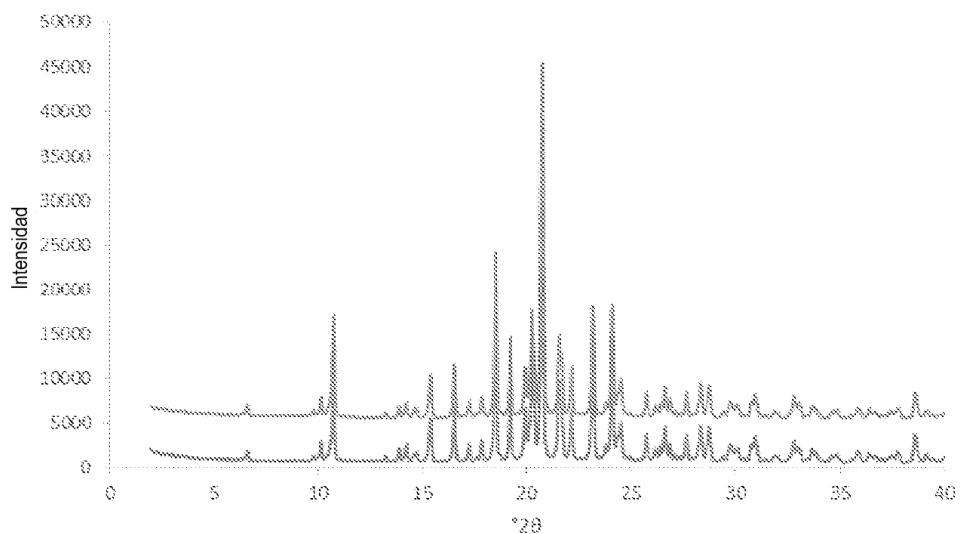


FIGURA 38

ES 2 941 630 T3

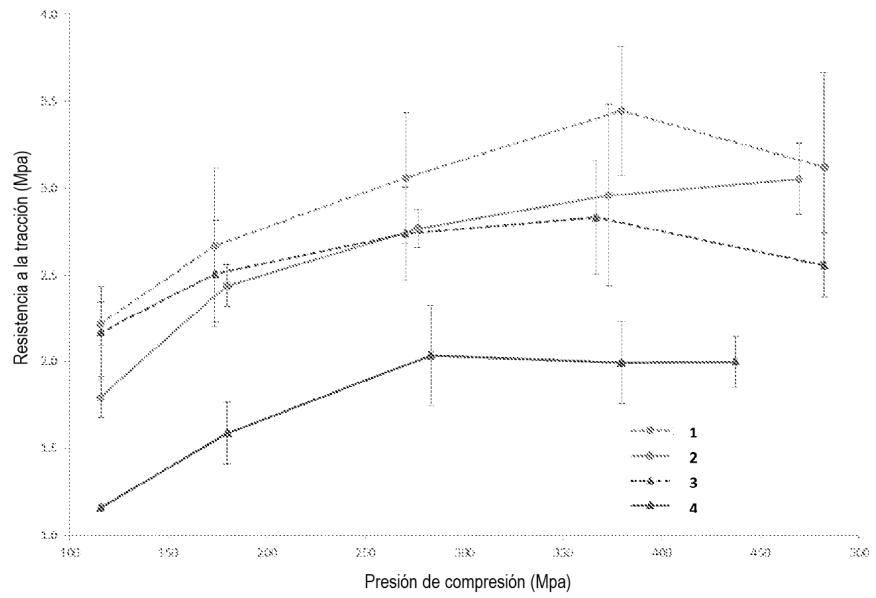


FIGURA 39

ES 2 941 630 T3

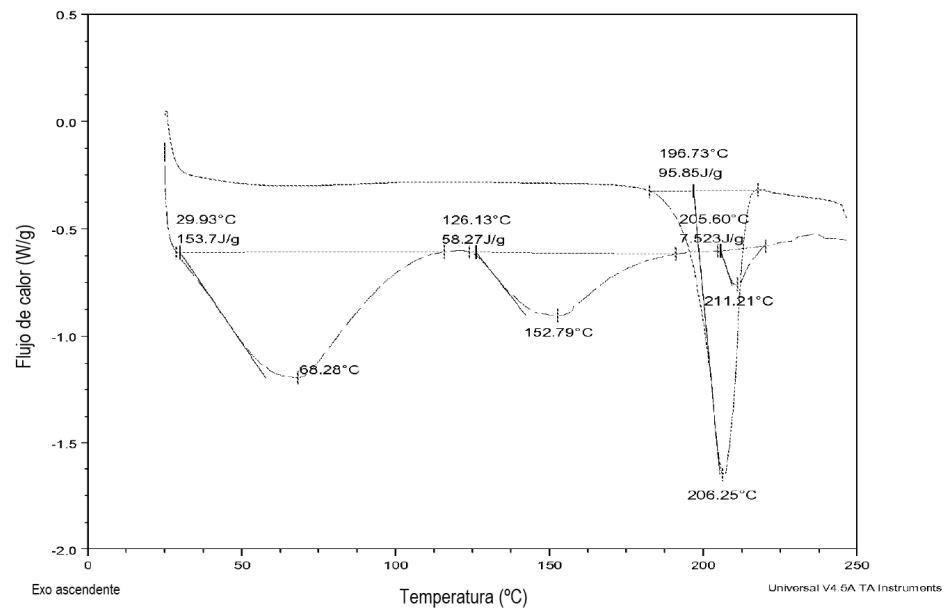


FIGURA 40

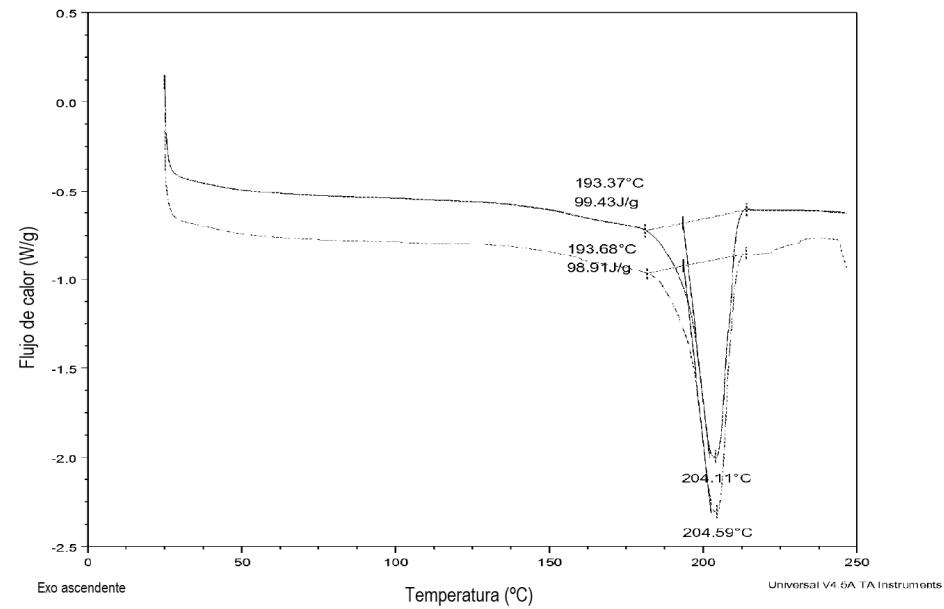


FIGURA 41

ES 2 941 630 T3

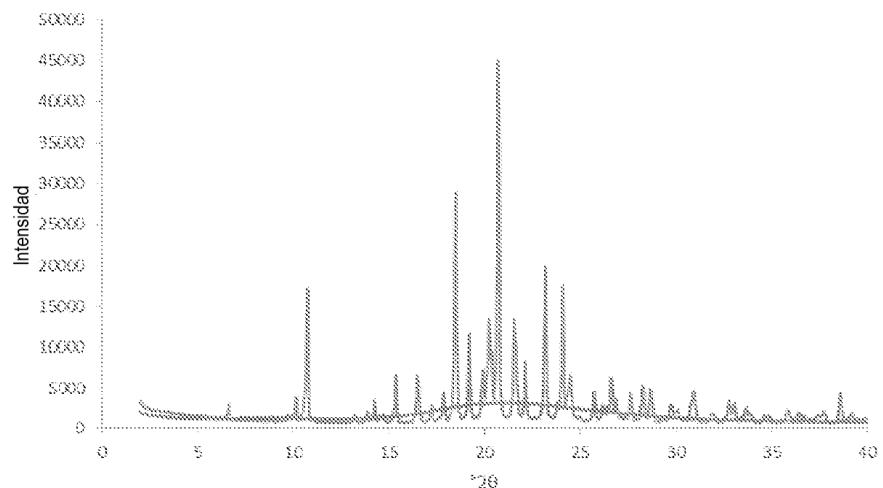


FIGURA 42

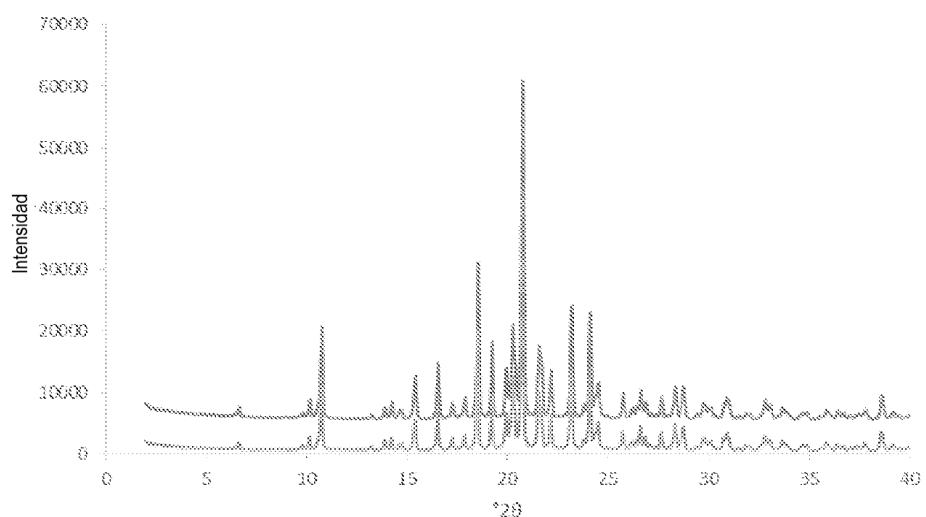


FIGURA 43

ES 2 941 630 T3

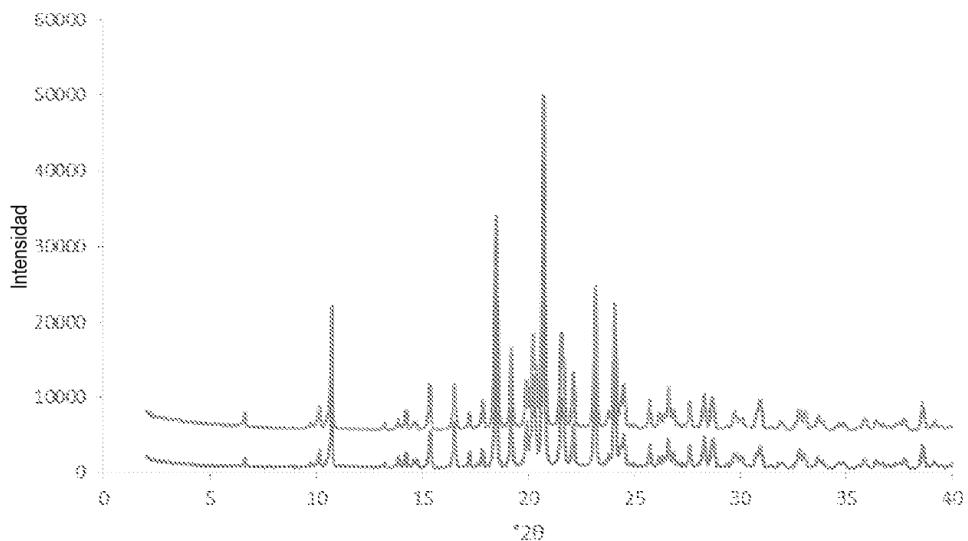


FIGURA 44

ES 2 941 630 T3

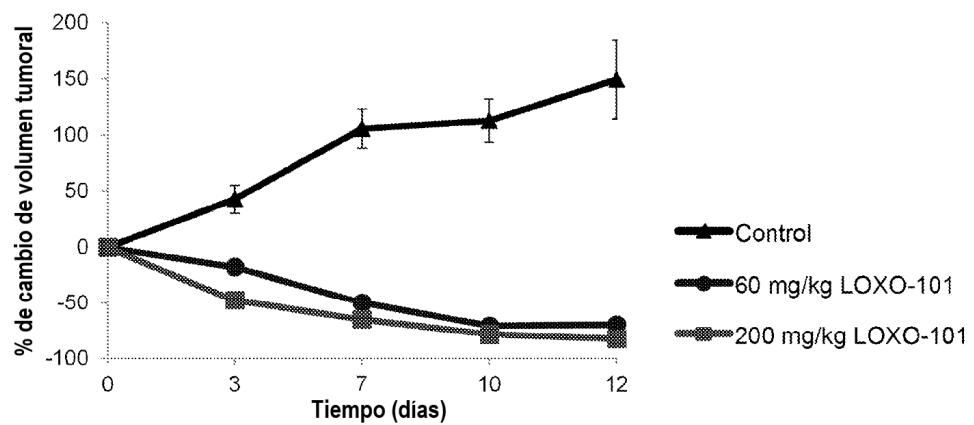


FIGURA 45

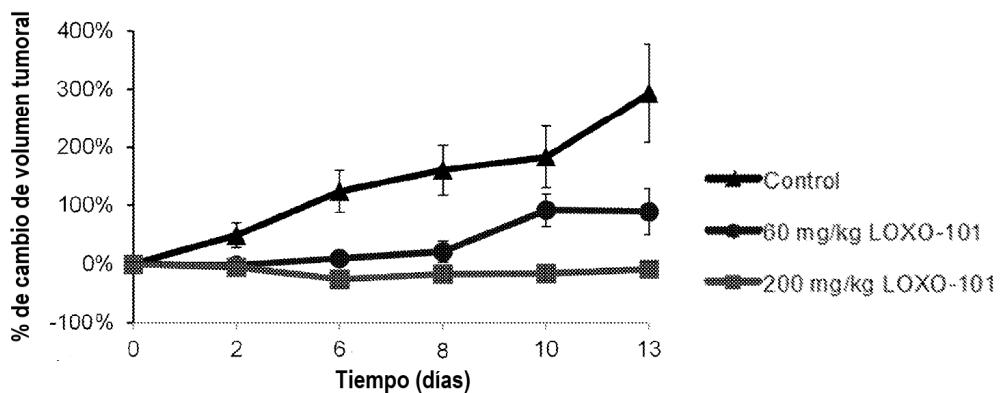


Figura 46

ES 2 941 630 T3

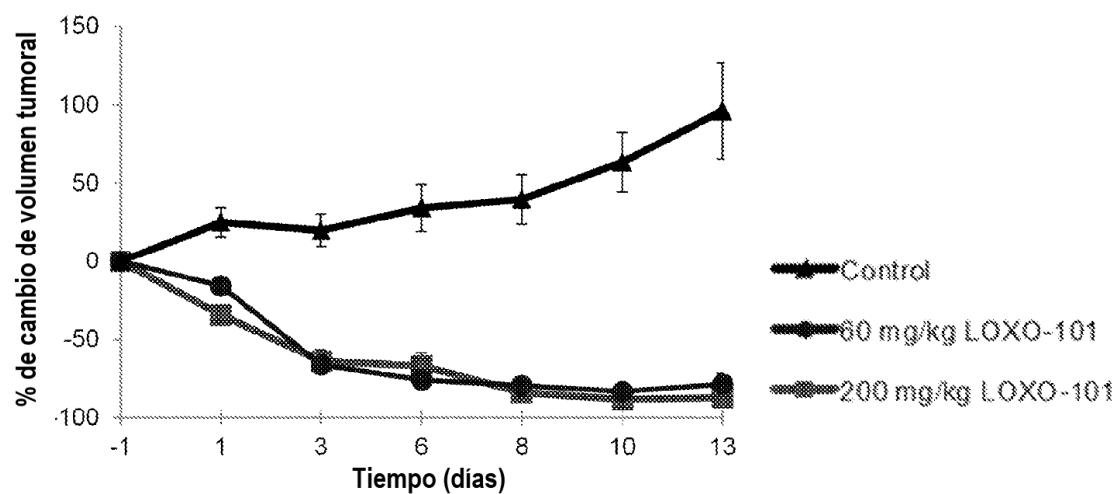


Figura 47