

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-014585- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 17:19:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPUESTO INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA
TRAYECTORIA NOTCH

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

DIRECCIÓN: Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 23 de enero de 2014



No. 14-014585- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 17:19:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000209

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center, Indianapolis,
Indiana 46285

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: (1) Philip Arthur HIPSKIND (2) Gregory Alan STEPHENSON

Dirección: (1) y (2) P.O. BOX 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/047100

Fecha

Julio 18, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/016081 A 1

Fecha

Enero 31, 2013

6

**Título(54) COMPUESTO INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA TRAYECTORIA
NOTCH**

Clasificación Internacional (51) C07K 5/06, A61K 38/05, C07D 401/04, A61P 35/00
A61P 35/02

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Julio 27, 2011

November 16, 2011

(31) Número de Solicitud

61/512,016

61/560,486

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

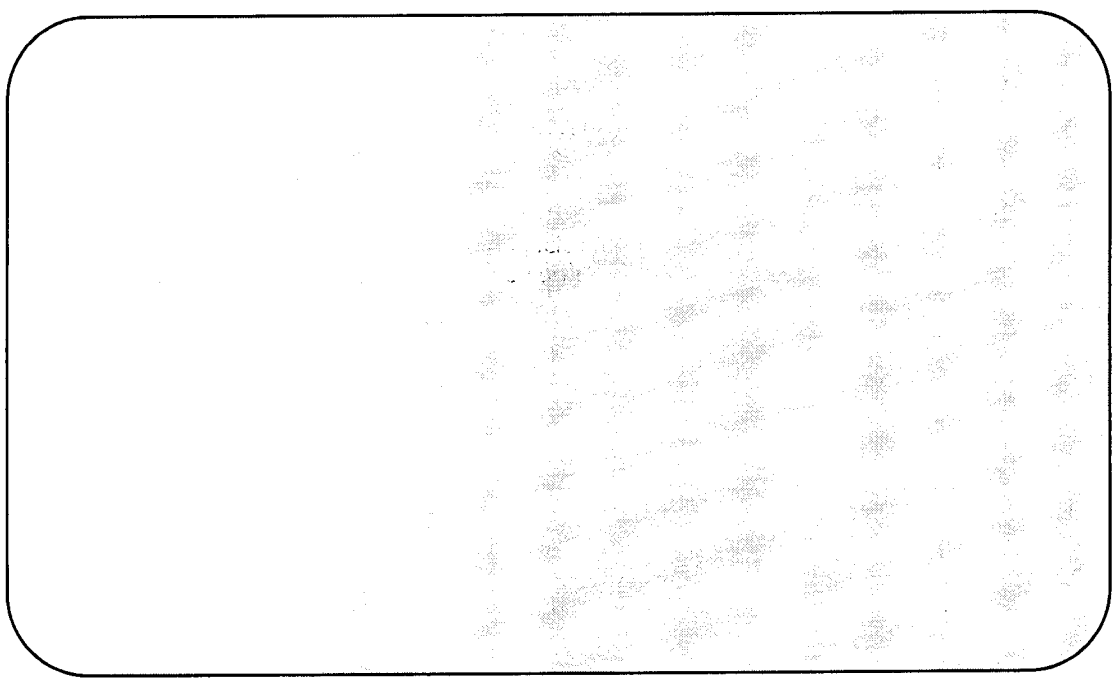
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

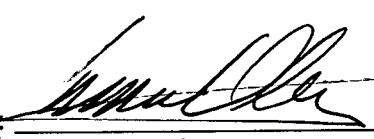
FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 008097

Bogotá D.C., Enero 24 de 2014 - 11:49:38

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	601308934	24/01/2014	8.186.700.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-014585- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 17:19:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 24 de 2014 - 11:49:42

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>2014</u> / <u>01</u> / <u>24</u> AAAA MM DD 2014	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14- 14585	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: EL CD. ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 7 ARCHIVOS 7 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS EL CD. SE ENCUENTRA UBICADO EN EL FOLIO (4)

JH



No. 14-014585- -00000-0000

Fecha: 2014-01-24 17:19:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

ADMI

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000209

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ELI LILLY AND COMPANY

Dirección: Lilly Corporate Center, Indianapolis,
Indiana 46285

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: (1) Philip Arthur HIPSKIND (2) Gregory Alan STEPHENSON

Dirección: (1) y (2) P.O. BOX 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/047100

Fecha Julio 18, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/016081 A 1

Fecha Enero 31, 2013

6

Título(54) COMPUESTO INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA TRAYECTORIA
NOTCH

Clasificación Internacional (51) C07K 5/06, A61K 38/05, C07D 401/04, A61P 35/00
A61P 35/02

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Julio 27, 2011

November 16, 2011

(31) Número de Solicitud

61/512,016

61/560,486

9

Comprobante de pago No. 14-

Fecha

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

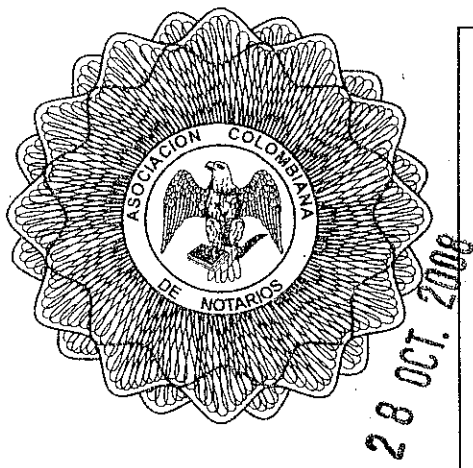
12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

WK 9397304



ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (1 2 2 7)

MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los Veintiocho -- (28) días del mes de Octubre -- -- del año dos mil ocho (2008), ante mi MARIA EUGENIA

ROJAS DE URUETA NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION DE PODER.-----

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS Y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA.-----

C.C. No. 79.376.996 Y 79.782.747.-----

Comparecieron JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS, mayor de edad vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.376.996 de estado civil casado con sociedad conyugal vigente y CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y dijeron:-----

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder y sus traducciones los cuales son del siguiente tenor:-----

PODER-----

El suscrito ELI LILLY AND COMPANY, domiciliado en Lilly Corporate Center, Indianápolis, Indiana 46285 US por medio del

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri, poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de patentes, modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones y demandas que por motivo de encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultades para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.-----

Firma (ilegible) -----

Fecha 17 July 2003 -----

City, Country/ Ciudad, País: Indianápolis, Indiana, United Status of America.- -----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia.- -----

APOSTILLA EN PODER DE DE REPRESENTACION DE ELI LILLY
AND COMPANY.

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapoles, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Meter G. Stringer, Director Ejecutivo y patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.- -----

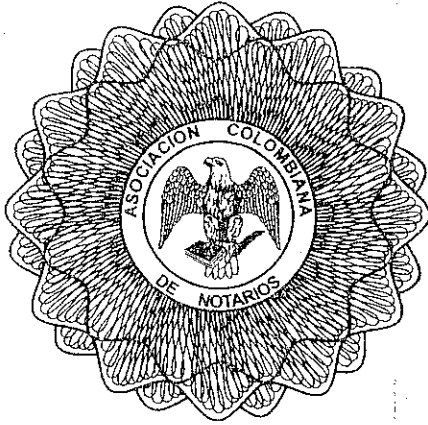
Todd Rokita Secretario de Estado -----

Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana -----

APOSTILLA

(Convencion de la Haya del 5 octubre 1961)

WK 9397305



1. País: Estados Unidos de América-
este documento público -----
2. Ha sido firmado por: Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario
de la Corte del Circuito en y para el
condado Jonson -----
- 4 Lleva el sello del Secretario de la Corte
del Circuito en y para el estado de Indiana -----

Certificado

5. En: Indianapoles, Indiana -----
6. El: 22 de julio de 2003.-----
7. Por el Secretario de Estado de Indiana 8 No. A2003-1279-----
9. Gran Sello del Estado de Indiana -----
10. Firma ilegible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana
- * Vigente desde el 1 de mayo de 2003, todas las apostillas de
Secretario y de Estado de Indiana tienen el sello impreso
electrónicamente. -----
- The Statehouse, Indianapoles, Indiana 46204, (307) 232-6531, fax
(317) 233-3283- -----

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario
Catherine Michel certifica que Meter G. Stringer, domiciliado en
7620 Castleton Faros, West Drive Indianápolis, Indiana- 46256
Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes
Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianápolis,
Indiana, Estados Unidos.--

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial inglés-
Español- Inglés-----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.- -----

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento:
Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de
Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité Ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.-----

Firma del notario público Catherine Michel certifica sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008- residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana.-----

Es traducción fiel de inglés, con copia archivo para confrontación, Bogotá 28 de julio-2003.-----

MARLEN NEIRA CASTRO Traductor e Intérprete Oficial Inglés-Español- Inglés -----

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987.------

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

Se advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -----

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
ELI LILLY AND COMPANY

Bilingüe inglés- español otorgado en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos el 17 de julio de 2003 y firmado por Peter G. Stringer, Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company.

Todd Rokita Secretario de Estado
Secretario de Estado de Indiana Estado de Indiana

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América- Este documento Público
2. ha sido firmado por Catherine Michel
3. Quien ejerce funciones de Secretario de la Corte del Circuito en y para el condado Johnson
4. Lleva el sello del Secretario de la Corte del Circuito en y para el estado de Indiana

CERTIFICADO

5. En Indianapolis, Indiana
6. El 22 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado de Indiana
8. No. A2003- 1127
9. Gran Sello del Estado de Indiana
10. Firma legible de Todd Rokita- Secretario de Estado de Indiana

* Vigente desde el 1 mayo de 2003, todas las apostillas del Secretario de Estado de Indiana tienen el sello impreso electrónicamente.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, fax (317) 233-3283

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 17 de julio de 2003 el suscrito notario Catherine Michel certifica que Peter G. Stringer, domiciliado en 7620 Castleton Farms, West Drive, Indianapolis, Indiana - 46256 Estados Unidos ejercía funciones de Director Ejecutivo y Patentes Internacionales de Ely Lilly & Company, con sede en Indianapolis, Indiana, Estados Unidos.


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

El otorgante fundamenta sus certificaciones en este documento: Delegación de Autoridad concerniente a Ciertas Materias de Patentes, suscrito el 20 de enero de 2003: conforme al poder otorgado al Asesor General de la Compañía por el Comité ejecutivo de la Junta Directiva de Eli Lilly and Company.

Firma del notario público Catherine Michel certifica

Sus funciones vencen el 21 de octubre de 2008 - residente en el condado Johnson

Sello de notario público de Indiana

--

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 28 de julio-2003.

Marlen Neira C



MARLEN NEIRA CASTRO

Traductor e Intérprete Oficial

Inglés - Español - Inglés

Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 US

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma

Date/Fecha: / 7 July 2003

City,Country/Ciudad,País: Indianapolis, Indiana, United States of America

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

NOTARIA VERIFICADA
BOGOTÁ - República de Colombia



Todd Rokita
Secretary of State

SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA



APOSTILLE

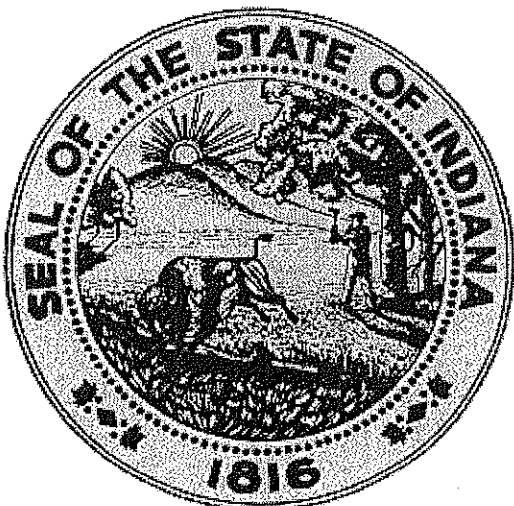
(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Catherine Michel*
3. acting in the capacity of circuit court clerk in & for *Johnson County*
4. and bears the seal/stamp of circuit court clerk in & for the State of Indiana

Certified

5. at Indianapolis, Indiana
6. this *Twenty-second day of July, 2003*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. *A2003- 11279*
9. Seal/Stamp:

10. Signature:




Todd Rokita

Indiana Secretary of State

*Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

The Statehouse, Indianapolis, Indiana 46204, (317) 232-6531, Fax (317) 233-3283

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
/ 7 July 2003
The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in
7620 Castleton Farms, West Drive,
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Executive Director, International
Patents
of ELI LILLY AND COMPANY

3. That ELI LILLY AND COMPANY
having its principal place of business located in
Indianapolis, Indiana, United States of
America

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Delegation of Authority Concerning Certain
Patent Matters, executed January 20, 2003;
pursuant to the authority granted to the
General Counsel of the Company by the
executive Committee of the Board of
Directors of Eli Lilly and Company

NOTARY PUBLIC (Signature):



Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Peter G. Stringer

mayor de edad y domiciliado
Indianapolis, Indiana 46256 US
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

de

4. Que
con sede principal ubicada en

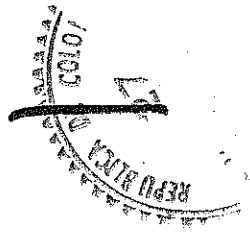
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Catherine Michel
Catherine Michel
My Commission Expires October 21, 2008
Resident of Johnson County

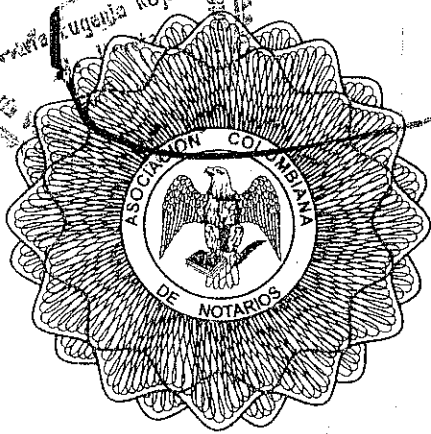
NOTARIO PUBLICO
Catherine Michel
Notario Eugenio Rojas de Hueta



ESPACIO EN BLANCO

ESPACIO EN BLANC

WK 9397306



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mí la(el)
Notaria(o) quién lo autoriza. ---Se

utilizaron las hojas de papel Notarial Nos. WK 9397304, WK 9397305 Y
WK 9397306 .

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCION 8850 DE 2007

IVA \$ 10.781.00

JAMES IAN RAISBECK LLÍNAS

C.C.No. 79.376.996 BOGOTA

TEL: 601-7700

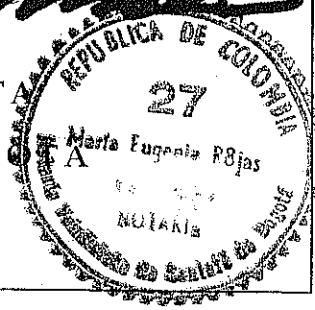
CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79.782.747 BOGOTA.

TEL: 601-7700

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

Es fiel y Segunda ^(2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 1227
de fecha 28 de Octubre de 2008
tomada de su original que expido en
Seis (6) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 28 OCT 2008
El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 61/512,016 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from HIPSKIND, Philip, Arthur to ELI LILLY AND COMPANY, dated 26 July 2011 (26.07.2011)

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application ELI LILLY AND COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 61/560,486 by virtue of the following:
VIII-3-2(i v)		an assignment from HIPSKIND, Philip, Arthur to ELI LILLY AND COMPANY, dated 15 November 2011 (15.11.2011)



(51) International Patent Classification:

C07K 5/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C07D 401/04 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/047100

(22) International Filing Date:

18 July 2012 (18.07.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/512,016 27 July 2011 (27.07.2011) US
61/560,486 16 November 2011 (16.11.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **HIPSKIND, Philip, Arthur** [US/US]; c/o Eli Lilly and Company, P. O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US). **STEPHENSON, Gregory, Alan** [US/US]; c/o Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(74) Agents: **DEMETER, John, C.** et al.; Eli Lilly and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-6288 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: NOTCH PATHWAY SIGNALING INHIBITOR COMPOUND

(57) Abstract: The present invention provides a compound, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate, and a pharmaceutical composition containing said compound, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate, useful as a Notch pathway signaling inhibitor for the treatment of cancer



-1-

NOTCH PATHWAY SIGNALING INHIBITOR COMPOUND

Notch signaling is an evolutionary conserved pathway that plays an integral role in development and tissue homeostasis in mammals. The Notch receptors and ligands contain single-pass transmembrane domains, are expressed on the cell surface and, for that reason, Notch signaling is particularly important in mediating communication between adjacent cells expressing the receptors and ligands. There are four known Notch receptors found in rodents and humans, termed Notch 1 to Notch 4. The Notch receptors are heterodimeric proteins composed of extracellular and intracellular domains that are initially synthesized as a single polypeptide. Receptor–ligand interaction triggers a series of proteolytic cleavages of the Notch receptor polypeptide in which γ -secretase activity is involved. γ -Secretase activity cleaves Notch intracellular domain from the cell surface which translocates to the nucleus to form a transcription factor complex. Notch intracellular domain (NICD) is the active form of the protein. Various Notch signaling functions include proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis, migration and self-renewal. These diverse roles of Notch signaling during the development and maintenance of normal tissues are aberrantly activated in different forms of cancer. The oncogenic functions of Notch signaling include the inhibition of apoptosis and the promotion of cell proliferation.

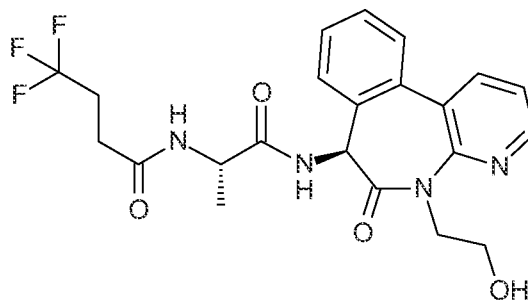
γ -Secretase plays a pivotal role in the Notch activation cascade. As a result, inhibitors of γ -secretase have been actively investigated for their potential to block Notch receptor activation. The compounds exemplified in WO 98/28268 such as 7C-203 are representative of such γ -secretase inhibitors. Despite the promise, no commercial Notch inhibitor chemotherapeutic agents have emerged.

There is a need to find compounds having Notch pathway signaling inhibitory activity. There is a further need to find compounds which have γ -secretase inhibitory activity. There is also a need to find compounds possessing distinct structural features that may contribute to Notch pathway signaling inhibition activity. There is a further need to find compounds demonstrating Notch pathway signaling inhibition activity and desirable *in vivo* distribution, metabolism and excretion properties.

-2-

Figure 1 is a representative X-ray powder diffraction pattern for the compound of Example 2.

One aspect of the invention is to provide a Notch signaling inhibitor compound of the structure:



Compound 1

or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof.

A second aspect of the present invention provides a pharmaceutical composition comprising 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, in association with a pharmaceutically acceptable carrier. In a particular embodiment, the pharmaceutical composition comprises 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, together with a pharmaceutically acceptable carrier and optionally other therapeutic ingredients.

A third aspect of the present invention provides a method of inhibiting Notch signaling in a cancer patient in need thereof, comprising administering a therapeutically effective amount of, 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, to said patient.

A fourth aspect of the present invention provides a method of treating a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer,

-3-

ovarian cancer, melanoma, lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer or medulloblastoma in a patient comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-
5 [[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof.

A fifth aspect of the present invention provides a method of treating a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma,
10 pancreatic cancer, glioblastoma or colorectal cancer in a patient comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof.

A sixth aspect of the present invention provides a compound 4,4,4-trifluoro-N-
15 [(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for use in therapy.

A seventh aspect of the present invention provides a compound 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-
20 methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for use in the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate
25 cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer or medulloblastoma.

An eighth aspect of the present invention provides a compound 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-
methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for use in the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute
30 lymphoblastic leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, pancreatic cancer, glioblastoma or colorectal cancer.

-4-

A ninth aspect of the present invention provides use of a compound 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer or medulloblastoma.

A tenth aspect of the present invention provides use of a compound 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, pancreatic cancer, glioblastoma or colorectal cancer.

The term "patient" means mammal and "mammal" includes, but is not limited to, a human.

"Therapeutically effective amount" or "effective amount" means the dosage of the compound, or pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, or pharmaceutical composition containing the compound, or pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, necessary to inhibit Notch signaling in a cancer patient, and either destroy the target cancer cells or slow or arrest the progression of the cancer in a patient. Anticipated dosages of Compound 1 or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof are in the range of 0.1 to 200 mg/patient/day. Preferred dosages are anticipated to be in the range of 1 to 175 mg/patient/day. Most preferred dosages are anticipated to be in the range of 5 to 150 mg/patient/day. The exact dosage required to treat a patient and the length of treatment time will be determined by a physician in view of the stage and severity of the disease as well as the specific needs and response of the individual patient. Although expressed as dosage on a per day basis, the dosing regimen may be adjusted to provide a more optimal therapeutic benefit to a patient and to manage and ameliorate mucoid

-5-

enteropathy (hypersecretion and accumulation of mucus in the gastrointestinal tract). In addition to daily dosing, dosing every other day (Q2D); every other day over a five day period followed by two days without dosing (T.I.W.); or every third day (Q3D) may be appropriate. A dosing regimen of every other day, T.I.W., or every third day is preferred along with administration (pre-, concomitant, or post-administration of Compound 1 of dexamethasone to manage or ameliorate mucoid enteropathy.

The terms "treatment," "treat," and "treating," are meant to include the full spectrum of intervention for the cancer from which the patient is suffering, such as administration of the active compound to alleviate to slow or reverse one or more of the symptoms and to delay progression of the cancer even if the cancer is not actually eliminated. The patient to be treated is a mammal, in particular a human being.

The compound of the present invention is preferably formulated as a pharmaceutical composition using a pharmaceutically acceptable carrier and administered by a variety of routes. Preferably, such compositions are for oral administration. Such pharmaceutical compositions and processes for preparing them are well known in the art. *See, e.g.*, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, *et al.*, eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995). In a particular embodiment, the pharmaceutical composition comprises 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzoazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, together with a pharmaceutically acceptable carrier and optionally other therapeutic ingredients particularly for treatment of cancer generally or a specific cancer type.

The compound of the present invention is capable of reaction with a number of inorganic and organic acids to form pharmaceutically acceptable acid addition salts. Such pharmaceutically acceptable salts and common methodology for preparing them are well known in the art. *See, e.g.*, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977.

Compound 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, may be prepared by a variety of procedures known in the art, as well as those described below.

-6-

The specific synthetic steps may be combined in different ways to prepare Compound 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof.

Compound 1 is named: 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide; and
5 may also be named: N-[(1S)-2-[[[(7S)-6,7-dihydro-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-5H-pyrido[3,2-a][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxoethyl]-4,4,4-trifluorobutanamide; and other names may be used to unambiguously identify Compound 1.

It will be understood Compound 1 is depicted as a single stereoisomer. There are two chiral centers giving rise to four stereoisomers. As used herein, references to
10 Compound 1 are meant to also include racemic mixtures including Compound 1. Herein, the Cahn-Ingold-Prelog designations of (R)- and (S)- are used to refer to specific isomers. Specific stereoisomers can be prepared by stereospecific synthesis using enantiomerically pure or enriched starting materials. The specific stereoisomers of either starting materials, intermediates, or racemic mixtures including Compound 1 can be resolved by
15 techniques well known in the art, such as those found in Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) and Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J. Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), including chromatography on chiral stationary phases, enzymatic resolutions, or fractional crystallization or chromatography of diastereomers formed for that purpose, such as
20 diastereomeric salts. While all mixtures containing the compound of the present invention are contemplated within the present invention, the preferred embodiment is Compound 1.

It has also been found that Compound 1 exists as atropisomers, or specific conformers. In aqueous solutions, 8-9% of atropisomer 2 (minor atropisomer) is detected
25 by ¹H NMR and LC-MS in equilibrium with atropisomer 1 (major atropisomer) at ambient temperature after 24 hours. In organic solvents, at ambient temperature after 24 hours, approximately 1-2% of atropisomer 2 is detected by ¹H NMR and LC-MS in equilibrium with atropisomer 1. Although detectable by ¹H NMR and LC-MS analysis, atropisomer 2 is not isolable.

30 The compounds employed as initial starting materials in the synthesis of the compound of the present invention are well known and, to the extent not commercially

-7-

available, are readily synthesized using specific references provided, by standard procedures commonly employed by those of ordinary skill in the art or are found in general reference texts.

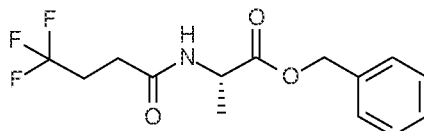
Examples of known procedures and methods include those described in general reference texts such as Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5th Edition, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4th Edition, Part B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000, etc., and references cited therein.

The intermediates and Compound 1 are named using a SymaxDraw version 3.2 Drawing Program, from the structures, as the IUPAC name consistently applied.

Preparation 1

Benzy (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoylamino)propanoate

Chiral



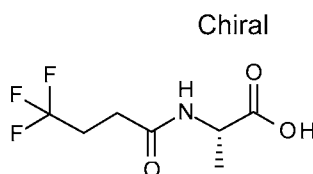
Add successively L-alanine benzyl ester hydrochloride (7.00 g, 32.5 mmol), diisopropylethylamine (28.30 mL, 162.3 mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (7.46 g, 48.7 mmol) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (9.33 g, 48.7 mmol) to a solution of 4,4,4-trifluorobutyric acid (7.131 g, 48.7 mmol) in dichloromethane (162 mL) at ambient temperature under nitrogen and stir for 20 hours. Add a 20% aqueous solution of citric acid (150 mL, 162 mmol), stir mixture for 5 minutes and separate layers. Extract from aqueous with dichloromethane (100 mL). Wash combined organics with saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (150 mL), dry over magnesium sulfate and concentrate. Purify the residue by flash chromatography, eluting with hexane: ethyl acetate (4:1 to 2:1) to give the title compound

-8-

as a white solid (9.22 g, 30.4 mmol, 94%). MS (m/z): 304(M+1); $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} = -44.6^\circ$ (c=5.0, methanol).

Preparation 2

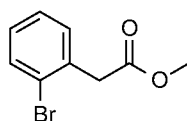
5 (2S)-2-(4,4,4-Trifluorobutanoylamino)propanoic acid



Add palladium/carbon (5%, 1.76 g, 0.8 mmol) in one portion to a solution of benzyl (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoylamino)propanoate (8.80 g, 29 mmol) in methanol (88 mL) at ambient temperature. Degas the mixture (vacuum/nitrogen), fill with
10 hydrogen (one atmosphere) and stir under hydrogen (29 mmol) for 5 hours. Filter through Celite®, rinse filter cake with methanol and concentrate the filtrate to obtain the title compound as a white solid (6.11 g, 28.7 mmol, 99%). MS (m/z): 214 (M+1); $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} = -24.7^\circ$ (c=5.0, methanol).

15 **Preparation 3**

Methyl 2-(2-bromophenyl)acetate



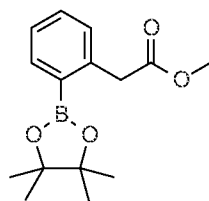
Add dimethylformamide (2.1 mL, 27.3 mmol) followed by thionyl chloride (52.3 mL, 717.8 mmol) over 7 minutes to a solution of 2-bromophenylacetic acid
20 (150.0 g, 683.6 mmol) in dichloromethane (1.50 L) cooled with an ambient temperature water bath. Stir mixture for 5 hours, add methanol (41.5 mL, 1.0 mol) over 5 minutes. Bubble nitrogen through solution overnight. Concentrate to obtain the title compound as

-9-

a colorless oil in quantitative yield (166.0 g, 724.7 mmol). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.57 (d, J= 7.9 Hz, 1H), 7.30-7.26 (m, 2H), 7.19-7.12 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

Preparation 4

5 Methyl 2-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]acetate

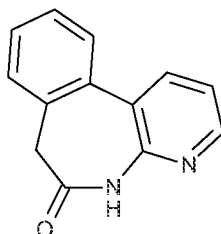


Degas a suspension of methyl 2-(2-bromophenyl)acetate (156.6 g, 684 mmol), bis(pinacolato)diboron (194.9 g, 752 mmol), and potassium acetate (135.6 g, 1.4 mol) in N-methylpyrrolidone (940 mL) with three vacuum/nitrogen cycles. Add (1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene)palladium(II) chloride (11.4 g, 13.7 mmol) and heat at 80°C. After 15 hours add (1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene)palladium(II) chloride (11.4 g, 13.7 mmol) and stir at 90 °C for 24 hours. Cool to ambient temperature and pour over a mixture of ice and water (3 L), and methyl tertiary butyl ether (1 L) was added. Stir mixture, filter through a pad of Celite® and separate layers. Extract from aqueous with methyl tertiary butyl ether (2x500 mL). Wash combined organics with water (2x500 mL), brine (500 mL), dry over sodium sulfate and concentrate. Purify the residue by flash chromatography, eluting with hexane: ethyl acetate (9:1) to give the title compound as a white solid (160.6 g, 581.6 mmol, 85%). MS (m/z): 277(M+1).

-10-

Preparation 5

5,7-Dihydropyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one

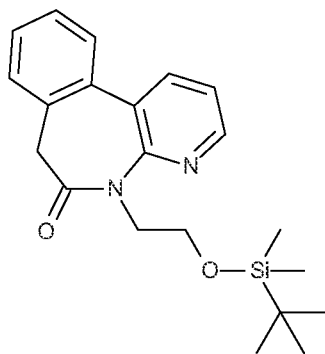


- Add potassium carbonate (235.7 g, 1.71 mol) to a solution of 2-amino-3-bromopyridine (88.5 g, 511.7 mmol) in 1,4-dioxane (550 mL) and water (550 mL). Degas the mixture with three cycles of vacuum/nitrogen, add palladium (II) acetate (6.4 g, 28.4 mmol) and tri-*t*-butylphosphonium tetrafluoroborate (16.5 g, 56.9 mmol) and stir under nitrogen at 88°C. Add a solution of methyl 2-[2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]acetate (157.0 g, 568.5 mmol) in 1,4-dioxane (550 mL) dropwise over three minutes and stir the mixture at 88°C for 20 minutes. Cool mixture to 50°C, add water (100 mL), and separate layers. Extract from aqueous with ethyl acetate (2x100 mL), dry combined organics over sodium sulfate and concentrate. Dissolve the concentrated material in *N*-methylpyrrolidone (314 mL), cool in ice bath and add sulfuric acid (314 mL, 5.9 mol) dropwise to maintain a temperature of approximately 45°C. Stir mixture at 140°C for 90 minutes. Cool to ambient temperature, add ice (4 kg) and basify with portion wise addition of 50% aqueous NaOH solution until solution is pH 7-8. Cool suspension to 10-15°C, filter out solids and wash with water (2 L), hexanes (1 L) and methyl tertiary butyl ether (1 L). Dry under vacuum at 40°C. Treat material with refluxing mixture of 10% methanol/dichloromethane solution and filter hot (x4). Concentrate combined filtrates to afford the title compound as a light brown solid (85 g, 404.3 mmol, 71%). MS (*m/z*): 211(*M*+1).

-11-

Preparation 6

5-[2-(tert-Butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one



Add cesium carbonate (186.6 g, 572.7 mmol), (2-bromoethoxy)-tert-butyl-
5 dimethyldimethylsilane (88.0 mL, 409.1 mmol), and sodium iodide (6.1 g, 40.9 mmol) to a
suspension of 5,7-dihydropyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (86.0 g, 409.1 mmol) in
dimethylformamide (860 mL) and stir at 70°C for 20 hours. Cool mixture to ambient
temperature, pour over ice and water (100 mL), add ethyl acetate (200 mL). Filter
mixture through Celite®, then wash with ethyl acetate (100 mL). Separate layers of
10 filtrate, extract from aqueous with ethyl acetate (2x50 mL). Wash combined organics
with water (2x100 mL), brine (100 mL), dry over sodium sulfate and concentrate.
Dissolve material in tetrahydrofuran (1.28 L), add Silia® bond palladium scavenger
(16.7 g) and stir at ambient temperature for 20 hours. Filter through a pad of silica, wash
with tetrahydrofuran (200 mL) and concentrate to obtain the title compound (155 g, 420.6
15 mmol) as a light brown oil that crystallizes in quantitative yield. MS (m/z): 369(M+1).

Method 2:

Heat a mixture 5,7-dihydropyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (22.5 g,
106.9 mmol) and dimethylformamide (500 mL) to 100°C for 5 minutes. Cool to 40°C,
20 add cesium carbonate (104.3 g, 320.1 mmol) and (2-bromoethoxy)-tert-
butyldimethyldimethylsilane (29.9 mL, 138.9 mmol) and stir at ambient temperature overnight.
Heat to 60°C for approximately 2 hours, and then cool to ambient temperature. Partition
the residue between ethyl acetate (1 L) and water (3 L), back extract from aqueous layer

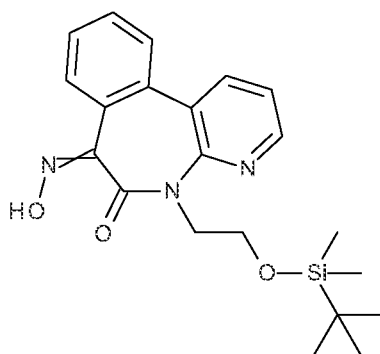
-12-

with ethyl acetate (2x500 mL), wash combined organics with brine (2x500 mL). Dry combined organics over sodium sulfate and concentrate. Purify the residue by flash chromatography, eluting with ethyl acetate: hexane (0:100 to 100:0) to give the title compound as an oil (39.4 g, 106.9 mmol, 89%). MS (m/z): 369(M+1).

5

Preparation 7

5-[2-(tert-Butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7-hydroxyimino-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one



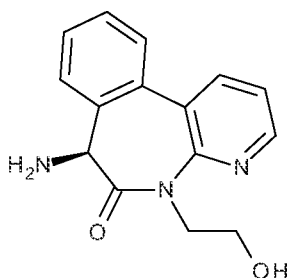
- 10 Add potassium 2-methylpropan-2-olate (66.1 g, 588.8 mmol) to a solution of 5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (155.0 g, 420.6 mmol) in tetrahydrofuran (1.6 L) at -5°C and stir for 10 minutes. Add isoamyl nitrite (61.9 mL, 462.6 mmol) dropwise at -5°C and stir mixture for 10 minutes. Pour over ice/water (2 L) and extract with ethyl acetate (3x200 mL). Wash combined organics
- 15 with brine (200 mL), dry over sodium sulfate. Add toluene (1 L) and concentrate (x3) to obtain the title compound as a thick brown oil (160.0 g, 402.5 mmol, 96%). MS (m/z): 398(M+1).

-13-

Preparation 8

(7S)-7-Amino-5-(2-hydroxyethyl)-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one

Chiral

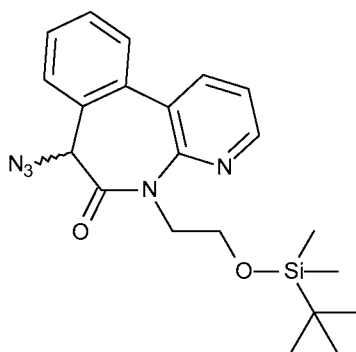


- Add trifluoroacetic acid (124.0 mL, 1.64 mol) in several portions to a solution of
- 5 5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7-hydroxyimino-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (155.0 g, 389.9 mmol) in a mixture of dichloromethane (620 mL) and methanol (310 mL) in an ambient temperature water bath. Add zinc (76.5 g, 1.2 mol) in several portions so that internal temperature was maintained at 33-38°C. Stir for 15 hours at ambient temperature. Filter mixture through Celite®, wash with 10% methanol /
- 10 dichloromethane (100 mL) and concentrate the filtrate. Add dichloromethane (0.5 L) and ice (500 g), stir and basify with a 50% aqueous solution of NaOH. Filter out solids, separate filtrate layers. Extract from aqueous with dichloromethane (2x100 mL), and concentrate combined organics. Slurry solids in hexane, and then filter and dry under high vacuum to obtain the racemate of the title compound as a light yellow solid (74.0 g,
- 15 274.8 mmol, 71%). Purify the material on a Chiralpak® AD column eluting with ethanol (0.2% dimethethylamine): acetonitrile (0:100 to 100:0) to obtain the title compound (35.0 g, 130 mmol, 33.3%) as a white solid. MS (m/z): 270(M+1); $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} = +187.83^\circ$ (c=6.9, methanol).

-14-

Preparation 9

7-Azido-5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one



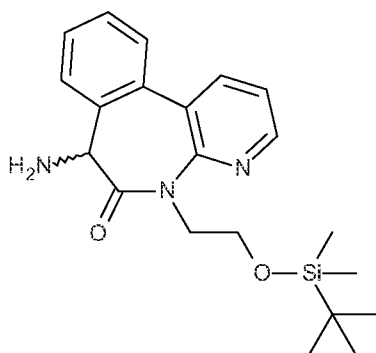
- Wash potassium hydride (approximately 2 scoops, 35 weight % in mineral oil)
- 5 with hexanes and decant to remove oil, add tetrahydrofuran (60 mL) and cool to -78°C . Dry a solution of 2,4,6-tris(1-methylethyl)-benzenesulfonyl azide (37.6 g, 121.6 mmol) in tetrahydrofuran (60 mL) over sodium sulfate for 45 minutes. Decant azide solution into the potassium hydride suspension over 15 minutes. Remove cold bath and allow it to warm to ambient temperature for 45 minutes; set aside dry solution. Cool a solution of
- 10 diisopropylamine (17.0 mL, 121.0 mmol) and tetrahydrofuran (50 mL) to -78°C , add n-butyl lithium (52.1 mL, 130.3 mmol) dropwise over 5 minutes. Remove cold bath and allow it to warm for 15 minutes then cool back to -78°C . Cannulate into a -78°C solution of 5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (34.3 g, 93.1 mmol) in tetrahydrofuran (400 mL) over 5-10 minutes. Stir for one hour at -
- 15 78°C then remove cold bath and allow it to warm for 15 minutes (to approximately -45°C). Cool to -78°C and add the dried 2,4,6-tris(1-methylethyl)-benzenesulfonyl azide solution via cannula over 5-10 minutes. Remove bath and allow to warm to -5 to 0°C over 1 hour. Cool in ice/water bath and add acetic acid (26.7 mL, 465.3 mmol) dropwise over 13 minutes. Allow to warm to ambient temperature over 65 minutes and quench
- 20 with saturated sodium bicarbonate solution (1L). Dilute reaction with ethyl acetate (600 mL) and water (2L), separate layers, back extract from aqueous with ethyl acetate (2 X 400 mL). Wash combined organics with saturated aqueous sodium bicarbonate solution (500 mL) and brine (500 mL), dry over sodium sulfate and concentrate. Purify

-15-

the residue by flash chromatography, eluting with ethyl acetate: hexane (0:100 to 100:0) to give the title compound as an oil (39.8 g, 92.3 mmol, 99%). MS (m/z): 410(M+1).

Preparation 10

5 7-Amino-5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one

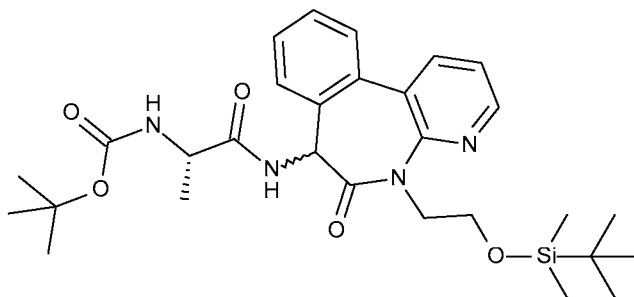


Add palladium/carbon (2.2 g, 1.0 mmol, 5% on carbon) to a nitrogen purged solution of 7-azido-5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (39.8 g, 92.3 mmol) in ethanol (923 mL). Evacuate/fill with hydrogen three times and stir under hydrogen (one atmosphere) at ambient temperature overnight. Filter over Celite®, rinse with ethanol and ethyl acetate and concentrate to obtain the title compound as a transparent oil (36.6 g, 89.9 mmol, 97%). MS (m/z): 384(M+1).

-16-

Preparation 11

tert-Butyl N-[(1S)-2-[[5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]carbamate

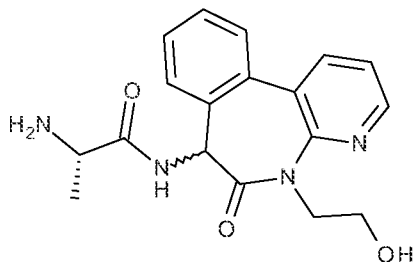


- 5 Cool a mixture of 7-amino-5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (36.3 g, 89.9 mmol), dichloromethane (360 mL), triethylamine (16.3 mL, 116.9 mmol), 3-hydroxytriazolo[4,5-b]pyridine (15.9 g, 116.9 mmol), and (2S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)propanoic acid (22.5 g, 116.9 mmol) to 0°C. Add 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (22.4 g, 116.9 mmol) and after 5 minutes allow to warm to ambient temperature overnight. Wash
- 10 with water (500 mL x2), saturated aqueous sodium bicarbonate solution (2 x 300 mL), brine (300 mL), and then dry over sodium sulfate and concentrate. Purify the residue by flash chromatography, eluting with isopropyl alcohol: hexane (5:95 to 10:90) to give the title compound as a white foam (43.14 g, 77.77 mmol, 86.50%). MS (m/z): 555(M+1).

-17-

Preparation 12

(2S)-2-Amino-N-[5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]propanamide



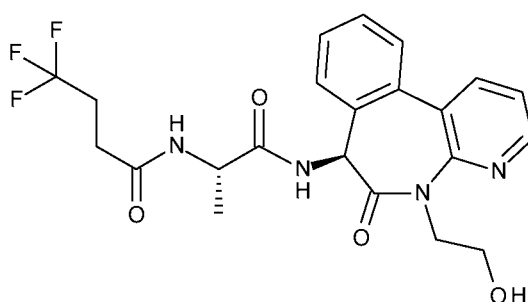
- 5 Add trifluoroacetic acid (30 mL, 396.76 mmol) over 5 minutes to a 0°C solution of tert-butyl N-[(1S)-2-[[5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]carbamate (5.56 g, 10.0 mmol) and dichloromethane (30 mL) and allow to warm and stir at ambient temperature for 5 hours. Purify the residue by flash chromatography via SCX® columns (Isolute SCX-2 x6)
10 eluting with methanol followed by ethyl acetate: methanol (2N ammonia) (1:1) to obtain the title compound as a white solid (3.48 g, 10.2 mmol) in quantitative yield. MS (m/z): 341(M+1).

-18-

Example 1

4,4,4-Trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide

Chiral



- 5 Add (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoylamino)propanoic acid (28.9 g, 135.7 mmol; prepared substantially as described above in Preparation 2), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (29.7 g, 155.1 mmol) sequentially to a suspension of (7S)-7-amino-5-(2-hydroxyethyl)-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (34.8 g, 129.2 mmol) in dichloromethane (696 mL) at 0°C, stir for 5 minutes. Add 1-
- 10 hydroxybenzotriazole monohydrate (24.7g, 155.1 mmol), allow it to stir for one hour, and then warm to ambient temperature. Add (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoylamino)propanoic acid (0.6 g, 2.6 mmol) and stir for 15 minutes at ambient temperature. Add water (600 ml), filter out white solid, and separate layers of filtrate. Wash organic layer with water (3x200 mL), dry over sodium sulfate and concentrate to afford a light brown foam.
- 15 Slurry material in 50% methyl tertiary butyl ether hexanes (500 mL), filter out solids, dry under high vacuum to obtain 65 g solids.

 Add water (195 mL) and potassium bicarbonate (14.0 g, 140.0 mmol) to a 10°C solution of the previously obtained solids (65.0 g, 140.0 mmol) in methanol (195 mL) and stir at ambient temperature for 29 hours. Concentrate and extract with dichloromethane

20 (3x50 mL). Wash combined organics with water (3x20 mL), dry over sodium sulfate and concentrate. Purify the residue by flash chromatography eluting with methanol: dichloromethane (98:2, 7N in ammonia). Triturate material from 50% methyl tertiary butyl ether /hexane, then triturate from methyl tertiary butyl ether (500 ml). Wash solids

-19-

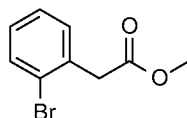
with methyl tertiary butyl ether (200 mL) and hexane (200 mL) and dry solids under high vacuum to obtain the title compound as an off-white solid (42.0 g, 90.4 mmol, 65%). MS (m/z): 270(M+1); $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} = -153.40^\circ$ (c=5.0, methanol).

5 Method 2:

Add 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (2.50 g, 13.0 mmol) to a 0°C mixture of (2S)-2-amino-N-[5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]propanamide (3.4 g, 10.0 mmol), dichloromethane (40 mL), 3-hydroxytriazolo[4,5-b]pyridine (1.8 g, 13.0 mmol), 4,4,4-trifluorobutanoic acid (1.9 g, 13.0 mmol), and triethylamine (1.8 mL, 13.0 mmol). Allow to stir and warm to ambient temperature overnight. Add water (40 mL) and partition between dichloromethane (100 mL) and water (50 mL). Separate layers, back extract from aqueous with dichloromethane, wash combined organic layers with saturated aqueous sodium bicarbonate solution (2 X 100 mL). Back extract from bicarbonate layers with dichloromethane (25 mL), dry combined organic layers over sodium sulfate and concentrate. Purify the residue by flash chromatography, eluting with methanol (2N ammonia): dichloromethane (0:100 to 5:95) to give 3.77 g of the diastereomeric mixture. Material was purified on a Chiralpak® AD column eluting with ethanol (0.2% dimethethylamine) : acetonitrile (0:100 to 100:0) to obtain the title compound as white solid (1.7 g, 3.7 mmol, 37%). MS (m/z): 465(M+1).

Preparation 13

Methyl 2-(2-bromophenyl)acetate



Combine 2-bromophenylacetic acid (500.0 g, 2.33 mol) with methanol (5.0 L) under a nitrogen atmosphere. Add concentrated sulfuric acid (185.8 mL) drop-wise at 20-35 °C, and then warm to 60-65 °C with stirring for 3-4 hours. Cool the reaction mixture to 45 °C and concentrate under reduced pressure below 45 °C to a volume of

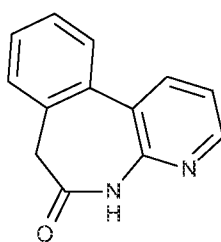
-20-

approximately 750 mL. Cool the reaction mixture to 10-30 °C and add dichloromethane (2.5 L). Adjust the pH to 7-8 with sodium hydroxide (7%, 380.0 mL) and separate the layers. Concentrate the organic phase to dryness under reduced pressure below 45 °C to obtain the title compound (516.5 g, 97.0%) as a yellow oil.

5

Preparation 14

5,7-Dihydropyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one



Combine methyl 2-(2-bromophenyl)acetate (1.0 kg, 4.36 mol), dioxane (11.0 L),
10 and *N*-methyl-2-pyrrolidone (7.0 L) with stirring at room temperature. Add
bis(pinacolato)diboron (1.2 kg, 4.58 mol) and potassium acetate (855.9 g, 8.72 mol) to the
mixture, and then degas the solution by passing nitrogen gas through the solution for 2-3
hours. Charge [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II) dichloride
dichloromethane adduct (71.2 g, 97.2 mmol) under an atmosphere of nitrogen and then
15 heat the reaction mixture to 80-90 °C for 18-20 hours to obtain methyl 2-[2-(4,4,5,5-
tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl]acetate as a solution which is used without
isolation. Cool the reaction mixture to 15-25 °C and add 2-amino-3-bromopyridine
(675.0 g, 3.90 mol) and a solution of potassium phosphate tribasic (2.41 kg, 11.3 mol) in
water (3.0 L). Degas the solution by passing nitrogen gas through the solution for 2-3
20 hours, and add [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene] palladium(II) dichloride
dichloromethane adduct (106.8 g, 130.8 mmol), then heat the reaction mixture to 80-90
°C for 18-40 hours. Cool the reaction mixture to 50-60 °C, and slowly add a solution
consisting of saturated sodium bicarbonate (13.0 L), saturated sodium chloride (13.0 L),
and water (13.0 L). Stir the mixture for 2-3 hours at 50-60 °C, cool to 15-25 °C and stir
25 for an additional 18-20 hours. Filter the resulting solids and wash the filter cake with
water (2 x 2.0 L). Transfer the solids to a clean reaction vessel, add ethyl acetate (5.0 L),

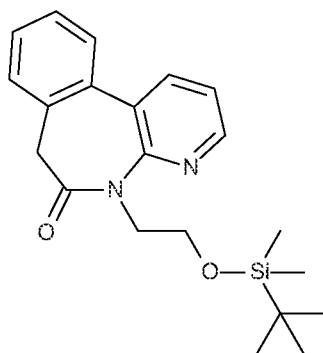
-21-

and heat the mixture to 60-70 °C for 2-3 hours. Cool the solution to 15 -25 °C and stir it for 1 -2 hours and filter the resulting solids. Wash the filter cake with ethyl acetate (2 x 750 mL) and dry the resulting solids under vacuum to provide the title compound (644.0 g, 68.1%) as an off-white solid.

5

Preparation 15

5-[2-(tert-Butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one



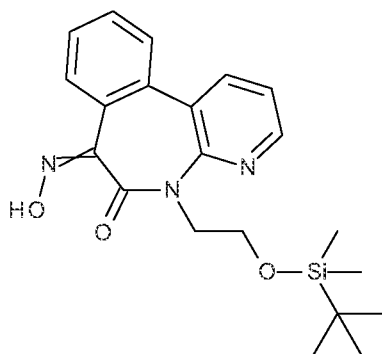
Add 5,7-dihydropyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (33.8 g, 0.16 mol) in
10 acetonitrile (340.0 mL) and stir at 20-30 °C for 0.5-1 hour. Add cesium carbonate (104.6 g, 0.32 mol) and (2-bromoethoxy)-tert-butyldimethylsilane (42.2 g, 0.18 mol) and heat the reaction mixture to 70-80 °C for 18-20 hours. Cool the reaction mixture to 20-25°C and filter through diatomaceous earth (50.6 g). Wash the filter cake with acetonitrile (2 x 50.6 mL) and concentrate the filtrate under reduced pressure to arrive at a total volume of
15 approximately 67.5 mL. Add toluene (152 mL), active carbon (2.53 g) and heat the mixture to 60-70 °C for 1-2 hours. Cool the mixture to 25-35 °C and filter the reaction mixture over diatomaceous earth (50.6 g). Rinse the filter cake with toluene (17.0 mL) and concentrate under reduced pressure to obtain the title compound as a light brown oil that crystallizes on standing(56.8 g, 92.2%).

20

-22-

Preparation 16

5-[2-(tert-Butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7-hydroxyimino-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one



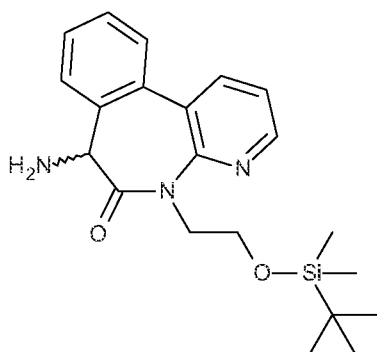
- 5 Combine 5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (30.0 g, 0.08 mol) and toluene (300.0 mL), cool the reaction mixture to -10-0 °C. Add potassium *tert*-butoxide (18.2 g, 0.16 mol), isoamyl nitrite (13.34 g, 0.11 mol) and then stir for 3-5 hours. Transfer the reaction mixture to a cool (0-5 °C) biphasic solution of ethyl acetate (210 mL) and water (510 mL) and stir for 15-30
- 10 minutes. Warm the reaction mixture to 15-25 °C and separate the layers. Extract the aqueous layer with additional ethyl acetate (120 mL) and methyl *tert*-butyl ether (120 mL) and combine the organic layers. Concentrate the organic under reduced pressure to a solution volume of approximately 60-90 mL and then add toluene (240 mL) and ethyl acetate (75 mL). Filter the solution through silica gel (45.0 g), rinse the silica gel with a
- 15 mixture of toluene (210 mL) and ethyl acetate (60 mL), and concentrate the filtrate under reduced pressure to a volume of approximately 75 mL. Add heptane (120 mL) and concentrate the mixture to a volume of approximately 60 mL and filter the resulting solids. Wash the filter cake with heptane (25 mL) and dry under vacuum to provide the title compound (28.3 g, 72.5%) as a yellow solid.

20

Preparation 17

7-Amino-5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one

-23-

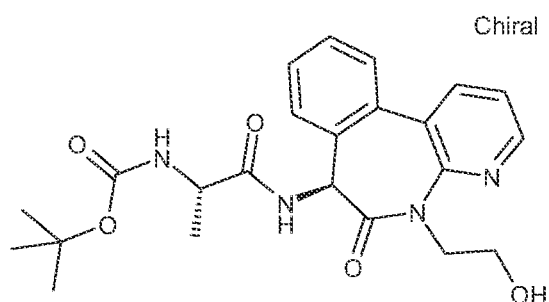


Combine 5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7-hydroxyimino-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (206.0 g, 0.52 mol) and tetrahydrofuran (2.3 L) into an autoclave under an atmosphere of nitrogen. Add Raney nickel (232.0 g, 1.13 wt/wt equivalents) to the reaction mixture and introduce hydrogen atmosphere (87 psi). Stir the reaction mixture at 60-65 °C for 24 hours. Filter the mixture over diatomaceous earth and wash the filter aid with tetrahydrofuran (500 mL). Concentrate the filtrate to obtain the title compound (196.0 g, 93.2%) as a brown oil. MS (m/z): 384 (M+1).

10

Preparation 18

tert-Butyl N-[(1S)-2-[[5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]carbamate



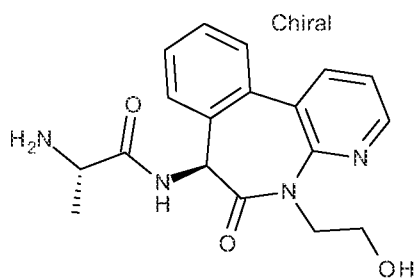
Combine 7-amino-5-[2-(tert-butyl(dimethyl)silyl)oxyethyl]-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-6-one (166.0 g, 0.43 mol), dichloromethane (2.2 L), and L-Boc-alanine (106.4 g, 0.56 mol) under nitrogen atmosphere. Add hydroxybenzotriazole (1.46 g, 10.8 mmol) and triethylamine (102.5 mL, 0.74 mol) maintaining the internal temperature below 30 °C. Add 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (128.2 g, 0.67 mol) in portions and stir for 16-18 hours at 20-30 °C. Purify the reaction mixture by silica gel

-24-

chromatography (300 g silica gel), eluting with dichloromethane (498 mLx2). Combine the dichloromethane solution and wash it with water (2 x 3.3 L). Concentrate the organic phase under reduced pressure to a volume of 300 mL to 400 mL and add ethyl acetate (664.0 mL). Concentrate the mixture under reduced pressure to a volume of 300-400 mL, and add ethyl acetate (664 mL). Concentrate the mixture under reduced pressure to a volume of 300-400 mL, and add ethyl acetate (1.3 L). Add tetra-*n*-butylammonium fluoride trihydrate (149.4 g, 0.47 mol) and stir for 16-18 hours at 20-30 °C. Add an aqueous solution of sodium chloride (20%, 1.6 L), separate the layers, and wash the organic phase again with aqueous sodium chloride (20%, 1.6 L). Concentrate the organic to an approximate volume of 800-900 mL and stir the mixture for 12-16 hours at 20-30 °C. Filter the resulting solids, wash the filter cake with ethyl acetate (91.3 mL). Purify the filtrate with silica gel chromatography (300 g silica gel), eluting with ethyl acetate (2 x 500 mL) to provide the title compound (82.6 g, 85.2% de, 100%ee, 51.2% yield) as a yellow oil. MS (m/z): 441 (M+1).

Preparation 19

(2S)-2-Amino-N-[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]propanamide



Combine *tert*-butyl N-[(1S)-2-[[5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]carbamate (54.0 g, 0.12 mol) and acetonitrile (212.7 mL) under a nitrogen atmosphere. Add hydrochloric acid (317.5 mL, 4N, 1.27 mol) drop-wise to maintain the internal temperature below 30 °C, and stir the reaction mixture for 16-18 hours at 20-30 °C. Add water (324.0 mL) and dichloromethane (430 mL) and separate the layers. Discard the organic layer and to the aqueous phase add dichloromethane (645 mL) and adjust the pH to approximately 10

-25-

using aqueous sodium hydroxide (20%, 252 mL). Separate the layers, extract the aqueous layer with additional dichloromethane (2 x 430 mL), and combine the organic phases.

Concentrate the organic under reduced pressure below 45 °C to an approximate volume of 130-150 mL, and add tetrahydrofuran (322 mL). Concentrate the solution under reduced

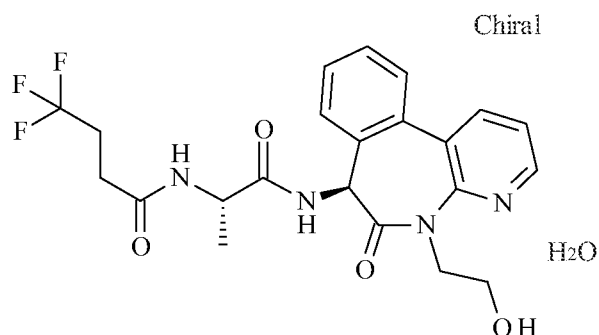
5 pressure below 45 °C to an approximate volume of 200-220 mL, and add additional tetrahydrofuran (213 mL). Concentrate the reaction mixture under reduced pressure to an approximate volume of 250-270 mL, and heat to 60-65 °C for 2-3 hours. Cool the reaction mixture to 5-15 °C slowly and stir for 5-8 hours. Filter the resulting solids, wash the filter cake with ethyl acetate (56 mL). Transfer the solids to a clean reaction vessel,

10 add ethyl acetate (150 mL), and heat to 60-65 °C for 2-3 hours, then cool the solution to 5-15 °C slowly. Stir for 2-3 hours at this temperature and collect the resulted solids by filtration. Wash the filter cake with ethyl acetate (45 mL) and dry the solids in an oven under reduced pressure below 60 °C to provide the title compound (21.0 g, 99.2%de, 100%ee, 51.0% yield) as an off white solid. MS (m/z): 341 (M+1).

15

Example 2

4,4,4-Trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide hydrate



20 Combine (2S)-2-amino-N-[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]propanamide (45.0 g, 132.2 mmol) and dimethylformamide (452.9 mL) under a nitrogen atmosphere. Cool to 0-5 °C and add *N*-ethyldiisopropylamine (77.4 mL, 444.0 mmol), 4,4,4-trifluorobutyric acid (19.9 g, 139.3 mmol), and hydroxybenzotriazole monohydrate (22.3 g, 153.1 mmol). Stir the solution for 5-10 min

25 and add 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (30.6 g, 159.6

-26-

mmol) in one portion. Warm the reaction mixture to 20-25 °C and stir for 1-2 hour. Add ethyl acetate (1.4 L) and water (1.8 L) and stir for 0.5- 1 hour. Separate the phases and wash the organic layer with an aqueous sodium bicarbonate solution (5%, 1.0 L) and concentrate the solution under reduced pressure to obtain a volume of 200-300 mL. Add ethanol (522 mL) and concentrate the solution under reduced pressure to obtain a volume of 200-300 mL. Repeat for three times. Add ethanol (180 mL) and 5 % solution of potassium carbonate (34.6 mL) and stir for 0.5-1 hour at 20~25 °C. Add water (667 mL) and seed crystals of 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hydroxyethyl)-6-oxo-7H-pyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]-1-methyl-2-oxo-ethyl]butanamide hydrate (0.4 g, 0.86 mmol) (Seed crystals can be generated from the solids obtained from previous lots of the product, or can be obtained using other methods common known and used by one skilled in the art, such as recrystallization of a small aliquot) and stir for 2-3 hours at 20-25 °C. Filter and wash the filter cake with a mixture of ethanol (63 mL) and water (42 mL) twice. Dry the resulting solids in an oven under reduced pressure below 40 °C to provide the title compound (41.9 g, 99.6%de, 100%ee, 65.3% yield) as a white to off white solid. MS (m/z): 465(M-H₂O+1).

XRPD of Example 2

The XRPD patterns of crystalline solids are obtained on a Bruker D4 Endeavor X-ray powder diffractometer, equipped with a CuK α source ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) and a Vantec detector, operating at 35 kV and 50 mA. The sample is scanned between 4 and 40° in 2 θ , with a step size of 0.0087° in 2 θ and a scan rate of 0.5 seconds/step, and with 0.6 mm divergence, 5.28mm fixed anti-scatter, and 9.5 mm detector slits. The dry powder is packed on a quartz sample holder and a smooth surface is obtained using a glass slide. It is well known in the crystallography art that, for any given crystal form, the relative intensities of the diffraction peaks may vary due to preferred orientation resulting from factors such as crystal morphology and habit. Where the effects of preferred orientation are present, peak intensities are altered, but the characteristic peak positions of the polymorph are unchanged. (For example, see: U. S. Pharmacopia 33 - National Formulary 28 Chapter < 941> Characterization of Crystalline Solids by X-ray Powder Diffraction

-27-

(XRPD) Official October 1, 2010-February 1, 2011). Furthermore, it is also well known in the crystallography art that for any given crystal form the angular peak positions may vary slightly. For example, peak positions can shift due to a variation in the temperature or humidity at which a sample is analyzed, sample displacement, or the presence or
 5 absence of an internal standard. In the present case, a peak position variability of ± 0.2 in 2θ will take into account these potential variations without hindering the unequivocal identification of the indicated crystal form. Confirmation of a crystal form may be made based on any unique combination of distinguishing peaks (in units of $^\circ 2\theta$), typically the more prominent peaks. The crystal form diffraction pattern is collected at ambient
 10 temperature (19-25°C) and relative humidity (20-60%).

Thus, a prepared sample of the compound of Example 2 is characterized by an XRPD pattern using CuK α radiation as having diffraction peaks (2-theta values) as described in Table 1 below. The form is crystalline and contains a peak at 22.97 degree in combination with one or more of the peaks selected from the group consisting of 11.96,
 15 18.81, 20.78, and 21.07 degrees 2-theta, with a tolerance for the diffraction angles of 0.2 degrees.

Table 1: X-ray powder diffraction peaks of Example 2:

Peak	Angle (2-Theta $^\circ$)	Intensity %
1	7.573	0.8
2	9.177	2.3
3	11.96	50.4
4	13.063	24.6
5	14.036	21.5
6	14.352	2.9
7	15.223	32.4
8	16.845	15.8
9	17.12	11.8

-28-

10	17.828	23.4
11	18.481	10.6
12	18.809	25.3
13	19.396	11.7
14	20.102	28
15	20.778	44.2
16	21.068	63.8
17	22.713	36.8
18	22.967	100
19	23.407	7.4
20	23.625	2.4
21	24.11	5.3
22	24.772	49
23	25.028	6.5
24	25.311	11.5
25	25.868	1.8
26	26.586	14.6
27	27.979	25.6
28	28.27	6.6
29	29.033	3.6
30	29.54	14.3
31	29.9	12.2
32	30.556	9.9
33	30.766	11.5
34	31.703	1.3
35	32.186	10.1

-29-

36	33.015	1.4
37	33.822	3.4
38	34.007	2
39	34.451	1.1
40	34.728	0.5
41	35.381	2.7
42	35.601	5.8
43	36.052	3.2
44	36.272	3.5
45	36.866	7.2
46	37.73	0.8
47	38.232	0.2
48	38.608	1.2
49	39.139	1.5

Solid State NMR of Example 2

¹³C Cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) NMR (solid-state NMR or SSNMR) spectra are obtained using a Bruker Avance II 400 MHz NMR spectrometer (Lilly tag K299547) operating at a carbon frequency of 100.622 MHz and equipped with a Bruker 4mm triple resonance probe (K299551). TOSS sideband suppression is used along with cross polarization employing SPINAL64 decoupling (70.8 Watts) and a RAMP100 shaped H-nucleus CP pulse. Acquisition parameters are as follows: 90° proton r.f. pulse width of 2.5 μs, contact time was 3.5 ms, pulse repetition time of 5 s, MAS frequency of 10 kHz, spectral width of 30 kHz, acquisition time is 34 ms and the number of scans is 10,587. Chemical shifts are referenced to adamantane (δ = 29.5 ppm) in a separate experiment. ¹³C NMR (solid-state): δ (ppm) 18.65, 27.52, 28.76, 47.66,

-30-

49.96, 55.02, 58.88, 122.87, 126.49, 129.73, 131.37, 132.31, 137.28, 145.01, 149.17, 168.53, 170.30, 175.55.

Karl Fischer Titration of Example 2

5 Karl Fischer titrations are obtained using a Brinkmann Methrohm 756 KF Coulometer. The control standard is determined using Hydranol® as a water standard in duplicate. Run the sample in triplicate and record the average percentage of water to determine the amount of water in a sample. Karl Fischer Titration average result of Example 2 is 3.9% water. Theoretic percentage of one molar equivalent of water in
10 Example 2 is 3.7%.

Cancer is increasingly recognized as a heterogeneous collection of diseases whose initiation and progression are induced by the aberrant function of one or more genes that regulate DNA repair, genome stability, cell proliferation, cell death, adhesion,
15 angiogenesis, invasion, and metastasis in cell and tissue microenvironments. Variant or aberrant function of the “cancer” genes may result from naturally occurring DNA polymorphism, changes in genome copy number (through amplification, deletion, chromosome loss, or duplication), changes in gene and chromosome structure (through chromosomal translocation, inversion, or other rearrangement that leads to deregulated
20 gene expression), and point mutations. Cancerous neoplasms may be induced by one aberrant gene function, and maintained by the same aberrant gene function, or maintenance and progression exacerbated by additional aberrant gene functions.

Beyond the genetic chromosomal aberrations mentioned above, each of the cancers may also include epigenetic modifications of the genome including DNA
25 methylation, genomic imprinting, and histone modification by acetylation, methylation, or phosphorylation. An epigenetic modification may play a role in the induction and/or maintenance of the malignancy.

Extensive catalogues of the cytogenetic aberrations in human cancer have been compiled and are maintained and regularly updated online (see The Mitelman Database of
30 Chromosome Aberrations in Cancer at the US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) Web site: <http://cgap.nci.nih.gov>). The database

includes chromosomal aberrations for at least some of the malignancies of the present invention. The Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project maintains a detailed online "Cancer Gene Census" of all human genes that have been causally linked to tumorigenesis (see <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>) as well as the

5 COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database of somatic mutations in human cancer (see <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). A further source containing abundant information on cytogenetic changes causally linked to various cancers is the Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/Anomliste.html#MDS>). These databases

10 also include chromosomal aberrations for at least some of the malignancies of the present invention.

Diagnosis of cancerous malignancies by biopsy, immunophenotyping and other tests are known and routinely used. In addition to high resolution chromosome banding and advanced chromosomal imaging technologies, chromosome aberrations in suspected

15 cases of cancer can be determined through cytogenetic analysis such as fluorescence in situ hybridization (FISH), karyotyping, spectral karyotyping (SKY), multiplex FISH (M-FISH), comparative genomic hybridization (CGH), single nucleotide polymorphism arrays (SNP Chips) and other diagnostic and analysis tests known and used by those skilled in the art.

20 The oncogenic role of Notch was first reported in human T-cell leukemia involving a translocation of the Notch1 intracellular domain to the T-cell receptor- β promoter region, resulting in the over expression of Notch1 intracellular domain (Grabher et al. *Nature Review Cancer*, 2006(6):347-359; Weng et al. *Science*, 2004(306):269-271). Over expression of Notch1 intracellular domain in hematopoietic progenitor cells of mice

25 caused the mice to exhibit T-cell acute lymphoblastic leukemia similar to humans. In addition to T-cell acute lymphoblastic leukemia, there is increasing evidence that Notch signals are oncogenic in other cancers through multiple mechanisms including receptor amplification and over expression of ligands and/or receptors including acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia

30 and erythroleukemia. Aberrant constitutive Notch signaling due to mutation or over expression of ligands and/or receptors is also implicated in a number of solid tumor

-32-

malignancies including breast cancer, ovarian cancer (Park et al. Cancer Research, 2006(66):6312-6318), melanoma (Gast et al. Genes, Chromosomes & Cancer, 2010(49):733-745), lung cancer, non small cell lung cancer (Westhoff et al. PNAS, 2009(106):22293-22298), pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer and medulloblastoma (Ranganathan et al., Nature Review Cancer, 2011(11):338-351 and Supplementary information S1 (table)). Inhibition of Notch signaling presents an attractive target to provide therapeutic benefits to cancer patients whose disease was induced by aberrant activation of constitutive Notch signaling pathway. Shih et al. Cancer Research, 2007(67)1879-1882.

The following in vitro and in vivo studies demonstrate the Notch pathway signaling inhibitory activity and efficacy of Compound 1 against various specific cancer cell lines. These assays are generally recognized by those skilled in the art as indicative of human clinical chemotherapeutic activity. Inhibition of Notch intracellular domain cleavage by γ -secretase is believed to be effective against each of Notch 1, Notch 2, Notch 3 and Notch 4 receptors. Assays evidencing Notch pathway signaling inhibitory activity and efficacy may be carried out substantially as follows or by similar assays affording similar data.

Notch1 NIICD Nuclear Accumulation Cellular Imaging Assay

HEK293ΔE12 cells (HEK293 cells are engineered to stably express mouse Notch1 cDNA coding for amino acid 1703-2183, NP_032740.3, with 23 amino acid signal peptide sequence, MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR (SEQ ID NO:1), at its N-terminus) are plated at 5000 cells/well in 96 well plates, incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose with 5% fetal bovine serum at 37 °C, 5 % CO₂ for 24 hours. Cells are treated with test compound, dosing at 10 points of 1:3 dilutions across the range of 1000 nM to 0.05 nM, and with final dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration at 0.2%. After 24 hours treatment, cell plates are processed through following steps sequentially: fix cells with 100μl/well PREFER™ fixative for 30 minutes at room temperature (RT); permeablize cells with 100μl /well 0.1% TRITON® X100 in phosphate buffered saline (PBS) for 20 min at RT; wash 3 times with 100μl /well PBS

-33-

each; add 50 μ l/well rabbit anti-NIICD (Notch1 Intracellular Domain) antibody, at 1:2000 in PBS with 1 % bovine serum albumin and incubate 1.5 hours at 37 °C; wash 3 times with 100 μ l/well PBS each; incubate with 50 μ l/well goat anti-rabbit IgG Alexa 488 at 1:1000 dilution in PBS with 1 % bovine serum albumin and incubate 1 hours at 37 °C ;

5 wash 3 times with 100 μ l/well PBS each and add 100 μ l/well 15 μ M propidium iodide with 50 μ g/ml RNase for 30 minutes to stain nuclei. Plates are scanned with ACUMEN EXPLORER™ Laser-scanning fluorescence microplate cytometer (TTP LABTECH LTD) to measure total cell nuclear count/well and total nuclear area/well with fluorescence at 655nm—705nm (emission of DNA bound propidium iodide) and

10 fluorescence of antibody binding to NIICD in nuclear region at 505nm—530nm. The main assay output is a ratio of total fluorescence of nuclear NIICD to total nuclear area, the normalized nuclear NIICD signal. A relative cytotoxicity profiling was collected as %cell number to 0.2% DMSO control cells. The antibody that recognizes cleaved Notch1 or NIICD is raised to a human peptide corresponding to the amino terminal cleavage site

15 of human Notch1 at Val1744. In untreated control cells, NIICD generated from Notch1 will translocate and accumulate in nucleus. When cells are treated by a Notch 1 cleavage inhibiting compound, the signal of nuclear NIICD will decrease. Concentration response and the IC₅₀ are determined by curve fitting to a four parameter logistic for the nuclear NIICD signal, while the %cell number is plotted in the same graph for cytotoxicity

20 profiling. Performing the assay essentially as described above, the average IC₅₀ for Compound 1 is 0.41nM (n=7). The compound does not affect cell number up to 1000 nM concentration.

These data evidence Compound 1 has affinity for Notch 1 and inhibits the intracellular accumulation of the Notch 1 intracellular domain cell signaling peptide.

25

Inhibition of NIICD cleavage in human tumor cell lines

To evaluate potency of Compound 1 in its ability to inhibit NIICD cleavage, several human tumor cell lines are utilized. A2780 is a human ovarian cell line (Sigma-Aldrich, No. 93112519); MIA PaCa-2 is a human pancreas cell line (ATCC No. CRL-1420); BxPC-3 is a human pancreas cell line (ATCC No. CRL-1687); SW480 is a human

30

-34-

colorectal cell line (ATCC No. CCL-228); HCT 116 is a human colorectal cell line (ATCC No. CCL-247); DLD-1 is a human colorectal cell line (ATCC No. CCL-221); MDA-MB-231 is a human mammary gland cell line (ATCC No. HTB-26); U-87 MG is a human glioblastoma cell line (ATCC No. HTB-14); A375 is a human malignant melanoma cell line (ATCC No. CRL-1619); CCRF-CEM is a human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell line (ATCC No. CCL-119); SUP-T1 is a human T-cell lymphoblastic leukemia cell line (ATCC No. CRL-1942); K-562 is a human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line characterized by the presence of a fusion transcript comprised of the Bcr and Abl1 genes (ATCC No. CCL-243); Jurkat, Clone E6-1 is a human acute T-cell leukemia cell line (ATCC No. TIB-152); MOLT-3 is a human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell line (ATCC No. CRL-1552); MOLT-4 is a human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell line (ATCC No. CRL-1582); HEL 92.1.7 is a human erythroleukemia cell line (ATCC No. TIB-180). Each of the cell lines are obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) at the ATCC number stated, except the A2780 cell line which is obtained from Sigma-Aldrich at the stated catalog number. The cells are grown in their respective culture media at 37°C in 5% CO₂ with humidity in the atmosphere. Cell culture media for A2780 human ovarian carcinoma is RPMI-1640 (without phenol red) with 2.05 mM L-glutamine, added 2 mM L-glutamine, 0.01 mg/ml insulin and 10% fetal bovine serum (FBS); for HCT 116 human colorectal carcinoma is McCoy's 5A with 1.5 mM L-glutamine, 0.075% Na-bicarbonate and 10% FBS; for SW480 human colorectal carcinoma is RPMI-1640 with 2.05 mM L-glutamine, 20 mM HEPES and 10% FBS; U-87 MG human glioblastoma is Minimal Essential Medium/Earl's Balanced Salt Solution with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acids (NEAA), 1 mM Na-pyruvate, and 10% FBS; for MIA PaCa-2 human pancreatic carcinoma is Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) without Na-pyruvate, with high glucose (4500 mg/ml), 4 mM L-glutamine, 2.5% horse serum and 10% FBS; for K-562 human CML is DMEM with high glucose (4500 mg/ml), 4 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 0.1 mM NEAA, 1 mM Na-pyruvate and 10% FBS; for Jurkat, Clone E6-1 human acute T cell leukemia is RPMI-1640 with 2.05 mM L-glutamine, 2.5 g/L glucose, 10 mM HEPES, 1 mM Na-pyruvate, 0.075% Na-bicarbonate and 10% FBS; for A-375 human malignant melanoma and MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma is DMEM with high glucose (4500 mg/ml), 4 mM L-glutamine and 10%

-35-

FBS; for BxPC-3 human pancreatic adenocarcinoma, DLD-1 human colorectal adenocarcinoma, SUP-T1 human lymphoblastic leukemia, MOLT-3 human ALL, Molt-4 human ALL, CCRF-CEM human ALL, and HEL 92.1.7 human erythroleukemia is RPMI-1640 with 2.05 mM L-glutamine, 2.5 g/L glucose, 20 mM HEPES, 1 mM Na-pyruvate, and 10% FBS. When 80-90% confluent, cells are treated with compound, dosing at 10 points of 1:3 dilutions across the range of 50 nM to 0.0025 nM, and with final dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration at 0.01%. After 24 hours treatment, cell plates are processed essentially through the following steps sequentially: Cells are collected after trypsinization, washed once with ice-cold PBS, and lysed in 100 µl ice cold XY lysis buffer (25 mM Tris pH 7.5, 10 µg/ml Trypsin/Chymotrypsin inhibitor, 10 µg/ml Aprotinin, 60 mM Beta-glycerol phosphate, 1% Triton® X-100, 10 mM NaF, 2.5 mM pyrophosphate, 150 mM NaCl, 15 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) pH 8.0, 5 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA) pH 8.0, 1 mM Na Vanadate, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM dithiothreitol, 1 µM microcystin LR, 10 µg/ml N-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 2 mM Na-p-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME), 15 mM 4-nitrophenyl phosphate di(tris) salt (PNPP), 0.1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), 5 mM benzamidine, 1 µM Okadaic Acid) containing 1X Complete tablet (Roche Complete™ No. 11 697 498 001) and 1X Protease Inhibitor cocktail (Sigma Aldrich P8340). Lysate is incubated on ice for 15 min with brief vortexing every 5 min and sonicated for 1 minute on ice. Samples are spun in a 4°C eppendorf centrifuge at 30,000 rpm for 30 minutes and 80 µl of supernatant is collected for analysis. Total protein concentration is determined using Pierce BCA Protein Assay Kit™ (Thermo Scientific, Rockford, IL) using a Thermomax™ plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

NIICD levels are determined using a custom NIICD Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Analyte is captured with a cleaved Notch1 (Val1744)-specific custom rabbit monoclonal antibody and detected with a C-terminal Notch1 SULFO-TAG® (Meso Scale Diagnostics, Gaithersburg, Maryland) polyclonal sheep antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN). Lysates are diluted to 1 µg/µl in ice-cold ELISA tris lysis buffer R60TX (Meso Scale Diagnostics, Gaithersburg, Maryland), containing 1X Complete tablet (Roche Complete™ mini No. 11 836 153 001) and 1X Protease Inhibitor cocktail (Sigma Aldrich P8340), and 25µl is added to the ELISA plate. Incubation of 25

-36-

µg protein lysate is done at RT for one hour each to capture analyte and with detection antibody. Plates are read on a Sector Imager 6000™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Background subtracted NIICD is normalized to total protein and presented as % inhibition relative to the vehicle-treated group. The IC₅₀ value is

5 determined by fitting concentration response data to “4-parameter sigmoidal dose-response (variable slope)” model using GraphPad Prism® 4 software. The IC₅₀ value for Compound 1 in various tumor cell lines is shown in Table 1.

Table 1

Cell Lines	IC ₅₀ (nM)
A2780	1.03
MIA PaCa-2	0.71
BxPC-3	0.39
SW480	0.10
HCT 116	0.72
DLD-1	0.98
MDA-MB-231	0.50
U-87 MG	0.28
A-375	0.48
CCRF-CEM	0.76
SUP-T1	1.24
K-562	0.74
Jurkat	5.95

-37-

MOLT-3	0.61
MOLT-4	0.74
HEL 92.1.7	0.23

The data in Table 1 evidences the potency of Compound 1 in its ability to inhibit N1ICD signaling peptide generation by inhibiting γ -secretase activity and as a result N1ICD signaling peptide accumulation in specific human tumor cell lines.

5

In-vivo efficacy and target inhibition studies

Animal studies

To evaluate in vivo efficacy and effect of Compound 1 on inhibition of Notch processing pharmacodynamics (PD), several cell lines- and patient-derived xenograft models are used. A2780 (2×10^6), SW480 (6×10^6), HCT 116 (6×10^6), U-87 MG (6×10^6), and A-375 (10×10^6) cells in a 1:1 matrigel mix (0.2 mL volume) are implanted by subcutaneous injection in the hind leg of 6-8 weeks of age athymic nude female mice (Harlan Laboratories). K-562 (6×10^6) cells in a 1:1 matrigel mix (0.2 mL volume) are implanted by subcutaneous injection in the hind leg of 6-8 weeks of age CD1 μ/μ female mice (Charles River Laboratories). HEL 92.1.7 (7×10^6) in a 1:1 matrigel mix (0.2 mL volume) are implanted by subcutaneous injection in the hind leg of 6-8 weeks of age CB17 severely combined immune deficient female mice (Taconic Farms). Patient-derived tumors are minced into 1-2 mm pieces and mixed with matrigel (1:1) in 0.2 ml volume and implanted by subcutaneous injection in the hind leg of 6-8 weeks of age athymic nude female mice (Harlan Laboratories). Patients-derived tumor models include: human glioblastoma (EL2144), human triple negative invasive ductal breast carcinoma (EL1997), and human colon carcinoma (EL1989, EL 1986, and EL 2056) with samples obtained after patient consent and hospital approval from IU Health, Methodist Hospital, Indianapolis, Indiana, USA 46206. A total of 7 to 10 mice are used for each group. Just before implantation for A2780, SW480, HEL 92.1.7, A-375, K-562, and patient-derived tumor models, animals are irradiated (450 Total Body Irradiation). Mice are fed *ad libitum* on normal chow. Treatment is initiated with oral administration (gavage) of

-38-

compound or vehicle (1% Na-CMC in 0.25% Tween-80) in 0.2 mL volume when tumor size reached to $150 \pm 50 \text{ mm}^3$. At designated time points following treatment, animals are sacrificed by CO₂ asphyxiation and cervical dislocation. Tumors are removed and used for PD response analysis. Tumor growth and body weight are monitored over time to evaluate efficacy and signs of toxicity. Bidimensional measurements of tumors are performed twice a week and tumor volumes are calculated based on the following formula: (Tumor Volume) = $[(L) \times (W^2) \times (\pi/6)]$ where L is mid-axis length and W is mid-axis width. Tumor volume data are transformed to a log scale to equalize variance across time and treatment groups. The log volume data are analyzed with a two-way repeated measures analysis of variance by time and treatment using the MIXEDTM procedures in SASTM software (version 8.2). The correlation model for the repeated measures is spatial power. Treated groups are compared to the control group at each time point. The MIXEDTM procedure is also used separately for each treatment group to calculate adjusted means and standard errors at each time point. Both analyses account for the autocorrelation within each animal and the loss of data that occurs when animals with large tumors are removed from the study early. The adjusted means and standard errors are plotted for each treatment group versus time. Antitumor activity is expressed as tumor growth inhibition percentage (TGI %) and is calculated by comparing tumor volume in the treatment group with vehicle treatment group. Percentage Tumor Growth Inhibition (%TGI) and statistical significance value (p value) for Compound 1 is measured essentially as described above and summarized in Table 2.

NIICD Analysis

To evaluate NIICD levels in tumors, approximately 75 mg is cut from the frozen tumor and minced prior to homogenization (actual mass recorded). Frozen tumor samples are transferred to Lysing Matrix-DTM tubes and re-suspended in ice-cold XY lysis buffer (25 mM Tris pH 7.5, 10 µg/ml Trypsin/Chymotrypsin inhibitor, 10 µg/ml Aprotinin, 60 mM Beta-glycerol phosphate, 1% Triton® X-100, 10 mM NaF, 2.5 mM pyrophosphate, 150 mM NaCl, 15 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) pH 8.0, 5 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA) pH 8.0, 1 mM Na Vanadate, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM dithiothreitol, 1 µM microcystin LR,

-39-

10 $\mu\text{g/ml}$ N-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 2 mM N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME), 15 mM 4-nitrophenyl phosphate di(tris) salt (PNPP), 0.1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), 5 mM benzamidine, 1 μM Okadaic Acid) containing 1X Complete tablet (Roche

5 Complete™ No. 11697 498 001) and 1X Protease Inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich P8340) at a mass: volume ratio of 75 mg/ml buffer. Tissues are homogenized in a Fast Prep FP120 homogenizer (Thermo Scientific, Rockford, IL) at a speed of 6.0 for 30 seconds at 4°C, followed by 15 minute incubation on ice. This is repeated for a total of 2-3 cycles until homogenization is complete. Lysates are spun in a 4°C eppendorf centrifuge

10 at 30,000 rpm for 15 minutes to remove debris. 400 μl of supernatant is removed and transferred to a new eppendorf tube and subjected to a freeze/thaw cycle. Samples are re-spun in a 4°C eppendorf centrifuge at 30,000 rpm for 30 minutes and 120 μl of supernatant is collected for analysis. Total protein concentration is determined using Pierce BCA Protein Assay Kit™ (Thermo Scientific, Rockford, IL) using a

15 Thermomax™ plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). NIICD levels are determined using a custom NIICD ELISA. Analyte is captured with a cleaved Notch1(Val1744)-specific custom rabbit monoclonal antibody and detected with a C-terminal Notch1 SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) polyclonal sheep antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN). Lysates are diluted to

20 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in ice-cold ELISA tris lysis buffer (R6OTX) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) containing 1X Complete tablet (Roche Complete™ mini No. 11 836 153 001) and 1X Protease Inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich P8340), and 25 μl is added to the ELISA plate. Incubation of 50 μg protein lysate is done at RT for one hour each to capture analyte and with detection antibody. Plates are read on a Sector Imager

25 6000™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Background subtracted NIICD is normalized to total protein and presented as % inhibition relative to the vehicle-treated group. NIICD % inhibition and statistical significance (p value) as measured by Dunett's method in tumors harvested 4 hours after last dose for Compound 1 is analyzed essentially as described above and summarized in Table 2.

-40-

Table 2.

Tumor Model	Dose (mg/kg)	Schedule	% TGI (p Value)	% N1HCD Inhibition (p Value)
A2780	10	Q2Dx11	56.55 (< 0.0001)	68.5 (< 0.0001)
A2780	10	Q3Dx8	32.99 (< 0.0001)	55.3 (< 0.0001)
A2780	3	(BID)QDx7+(BID)Q2Dx7	72.35 (< 0.0001)	50.7 (0.0004)
A2780	3	QDx21	46.60 (< 0.0001)	62.8 (< 0.0001)
A2780	10	Q2Dx13	51.11 (< 0.0001)	74.8 (< 0.0001)
A2780	8	Q2Dx13	68.60 (< 0.0001)	71.7 (< 0.0001)
A2780	7	Q2Dx13	56.95 (< 0.0001)	65.9 (< 0.0001)
A2780	6	Q2Dx13	36.33 (< 0.05 to < 0.01)	60.7 (< 0.0001)
A2780	3	Q2Dx13	36.65 (< 0.05 to < 0.01)	58.6 (< 0.0001)
A2780	1.5	QDx26	33.36 (< 0.05 to < 0.01)	59.0 (< 0.0001)
SW480	8	(Mon, Wed, Fri)x5	61.00 (< 0.0001)	72.5 (= 0.0002)
HCT 116	8	(Mon, Wed, Fri)x4	37.58 (< 0.05 to < 0.01)	73.0 (= 0.0005)
U-87 MG	8	(Mon, Wed, Fri)x4	53.33 (< 0.0001)	87.8 (< 0.0001)
A-375	8	(Mon, Wed, Fri)x4	28.47 (NS)	77.5 (< 0.0001)
K-562	8	(Mon, Wed, Fri)x4	54.96 (< 0.01 to	47.6 (< 0.0001)

-41-

			< 0.001)	
HEL 92.1.7	8	Q2dx14	7.20 (NS)	56.7 (< 0.0001)
EL1997	10	(Q2Dx7), 11-days OFF,	80.28 (< 0.0001)	67.9 (< 0.0001)
	8	(Mon, Wed, Fri)x4		
EL1989	10	(Q2Dx7), 11-days OFF,	70.42 (< 0.0001)	79.2 (< 0.0001)
	8	(Mon, Wed, Fri)x3		
EL2144	10	Q2Dx8	53.37 (< 0.0001)	ND*
EL2056	8	(Mon, Wed, Fri)x5	59.05 (< 0.0001)	83.5 (< 0.0001)
EL1986	8	(Mon, Wed, Fri)x5	62.00 (< 0.0001)	84.9 (< 0.0001)

* Not Determined

The data in Table 2 evidences the tumor growth inhibition, and the inhibition of NIICD cleavage by Compound 1 in various xenograft models of human tumor. The data in Table 2 further provides an in vivo correlation to the functional activity cell data described in Table 1.

Metabolism and Excretion

Compounds that demonstrate low or no Cytochrome P450 (CYP450) metabolism and modulation have a reduced likelihood for adverse interactions with other medications the patient is taking that could result in dose changes or a need to stop medication altogether. When CYP450 metabolism leads to appreciable exposure of patients to active metabolites, efficacy and safety issues can arise from the greater variability associated with the contribution of multiple active species; therefore, generally a drug lacking active metabolites is preferred. Therapeutic agents evidencing low or no CYP450 metabolism and modulation are desirable and may have superior safety profiles in and for patients. Lynch et al., Am. Fam. Physician, 76, 391 (2007). The potential for CYP450 enzyme interactions cannot be predicted based solely on the structure of an active pharmaceutical agent.

-42-

Compound 1 is not an inhibitor or inducer of the major CYP450 enzymes and was not metabolized to any appreciable extent by liver microsomes optimized for oxidative CYP450 metabolism. In rats and dogs *in vivo*, major oxidative metabolites were not observed in circulation or excreta. Therefore, Compound 1 has a low likelihood for CYP450-based interactions with other medications that could result in dose adjustments or a need to limit or stop additional medications in a patient being treated for cancer.

Compound 1 was evaluated *in vivo* in bile-duct cannulated rats to study systemic pharmacokinetics (PK), excretion, and metabolism. *In vivo* 51% of the IV dose was excreted unchanged, predominately in the urine, with low (2% of parent) systemic exposure to an active N-dealkylated metabolite, 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-1-methyl-2-oxo-2-[[[(7S)-6-oxo-5,7-dihydropyrido[2,3-d][3]benzazepin-7-yl]amino]ethyl]butanamide. Profiling of rat plasma for metabolites, indicated the absence of additional circulating metabolites. Further studies in bile-duct intact dogs also supported appreciable clearance by excretion of parent compound, as well as the absence of major circulating active metabolites.

Overall metabolism and excretion data for Compound 1 evidenced desirable clearance mechanisms (urinary excretion of parent compound and amide hydrolysis to an inactive and non-circulating fragment, which is not formed in incubations with liver microsomes optimized for CYP450 metabolism), as well as the absence of major active circulating metabolites.

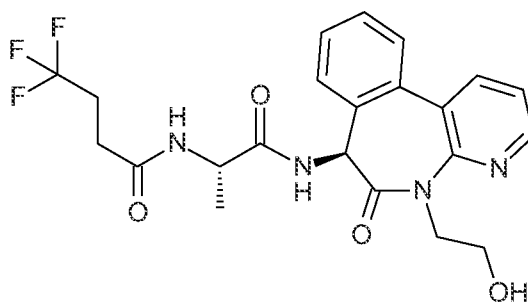
In the clinical setting, the clearance properties of Compound 1 observed preclinically are desirable. Compounds eliminated primarily by oxidative metabolism are known to exhibit variable exposure due to drug interactions with concomitant medications and certain fruit juices/herbs, liver disease, and inter-patient differences in enzyme activity. Multiple clearance mechanisms are preferred, because they diminish the impact of drug interactions occurring at any one elimination pathway. Therefore, clearance of Compound 1 by both excretion (51%) and metabolism (amide hydrolysis), without production of major active circulating metabolites, is advantageous to the patient. Overall these clearance properties decrease the likelihood for clinical dose adjustments, as well as minimize safety and efficacy concerns associated with major active circulating

-43-

metabolites, administration of concomitant medications, and inter-patient differences in CYP450 activity.

We claim:

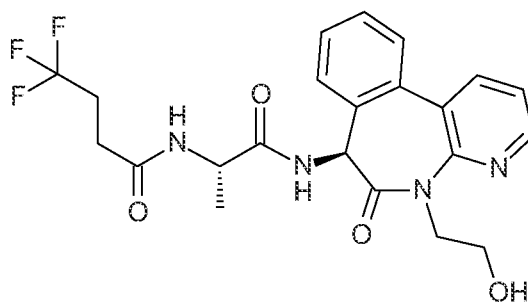
- 5 1. A compound of the structure:



Compound 1

- 10 or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof.

2. A compound of the structure:



Compound 1

- or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

-45-

3. A pharmaceutical composition comprising a compound of Claim 1, 2-oxo-ethyl]butanamide, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, in association with a pharmaceutically acceptable carrier.

4. A method of inhibiting Notch signaling in a cancer patient in need thereof, comprising administering a therapeutically effective amount of a compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, to said patient.

5. A method of treating a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer or medulloblastoma in a patient comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate.

6. A method of treating a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, pancreatic cancer, glioblastoma or colorectal cancer in a patient comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof.

7. A compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for use in therapy.

8. A compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for use in the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer or medulloblastoma.

9. A compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for use in the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia,

-46-

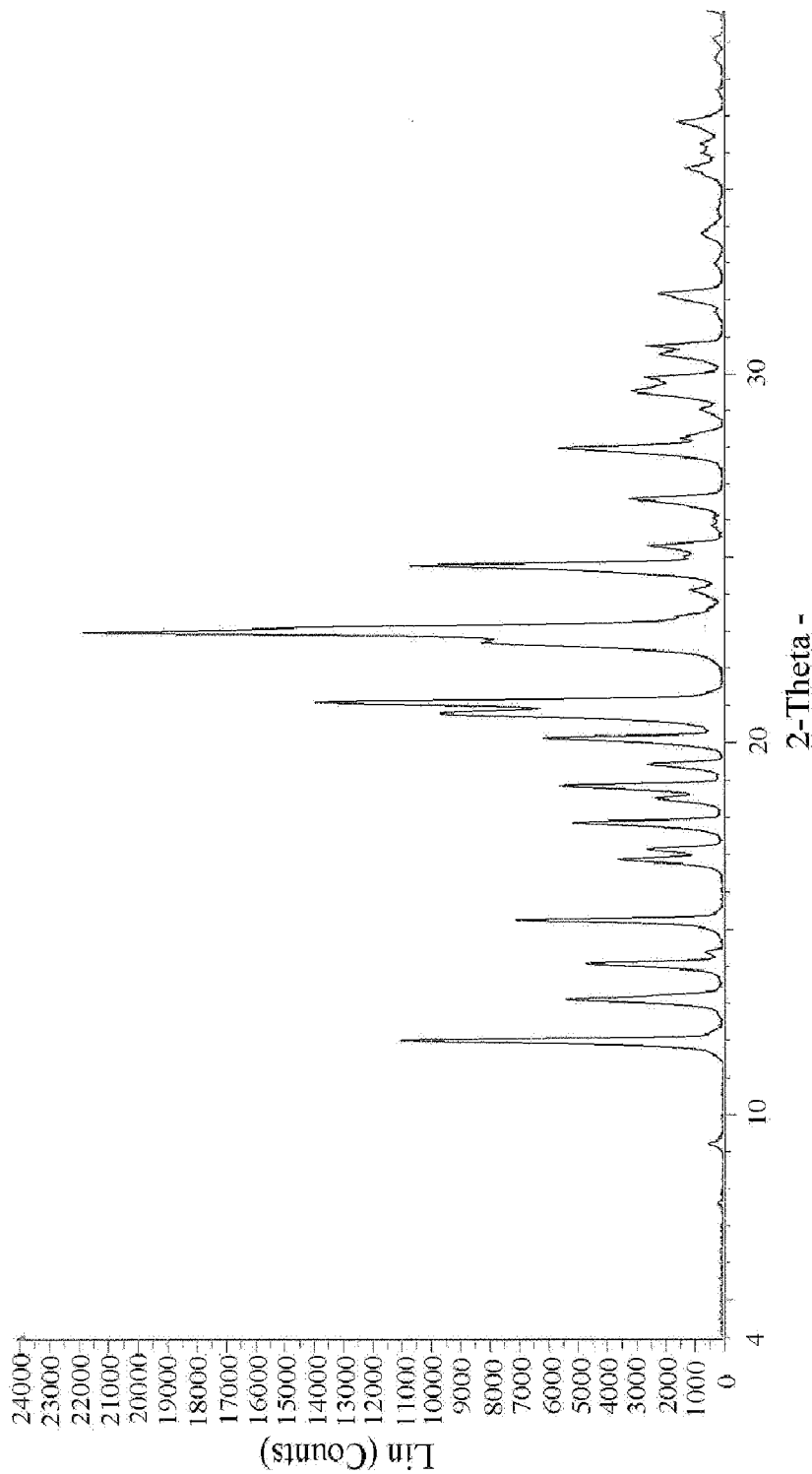
chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, pancreatic cancer, glioblastoma or colorectal cancer.

10. Use of a compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of a cancer which
5 is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, colorectal cancer, head and neck cancer, cervical cancer, prostate cancer, liver cancer, squamous cell carcinoma (oral), skin cancer or medulloblastoma.

10 11. Use of a compound of Claim 1, or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of a cancer which is T-cell acute lymphoblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic myelogenous leukemia, erythroleukemia, breast cancer, ovarian cancer, melanoma, pancreatic cancer, glioblastoma or colorectal cancer.

15 12. A compound of Claim 1 which is a crystalline hydrate characterized by an X-ray powder diffraction pattern using CuK α radiation having a peak at 22.97 ± 0.2 degrees 2-theta in combination with one or more peaks at 11.96 ± 0.2 , 18.81 ± 0.2 , 20.78 ± 0.2 or 21.07 ± 0.2 degrees 2-theta at ambient temperature and relative humidity.

Fig 1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/047100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K5/06 A61K38/05 C07D401/04 A61P35/00 A61P35/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/28268 A2 (ATHENA NEUROSCIENCES INC [US]; LILLY CO ELI [US]; WU JING [US]; TUNG J) 2 July 1998 (1998-07-02) cited in the application claim 90 -----	1-12
A	WO 2011/060051 A1 (UNIV MASSACHUSETTS [US]; ROSS ALONZO H [US]; GILBERT CANDACE [US]; MOS) 19 May 2011 (2011-05-19) claims 1, 7 -----	1-12
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 12 September 2012	Date of mailing of the international search report 19/09/2012	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Jetter, Sonya	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/047100

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐	on paper
☒	in electronic form
 - b. (time)

☒	in the international application as filed
☐	together with the international application in electronic form
☐	subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/047100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828268	A2	02-07-1998	AR 010854 A1 12-07-2000
		AT 421509 T 15-02-2009	
		AU 749658 B2 27-06-2002	
		BR 9714517 A 04-07-2000	
		CA 2272305 A1 02-07-1998	
		CN 1242007 A 19-01-2000	
		CN 1616432 A 18-05-2005	
		CO 4930282 A1 27-06-2000	
		DK 0951466 T3 16-03-2009	
		EP 0951466 A2 27-10-1999	
		ES 2319239 T3 05-05-2009	
		HR P970705 A2 31-10-1998	
		HU 0001232 A2 28-10-2000	
		ID 22177 A 09-09-1999	
		JP 3812952 B2 23-08-2006	
		JP 2000511932 A 12-09-2000	
		NO 993098 A 20-08-1999	
		NZ 335583 A 30-03-2001	
		PL 334305 A1 14-02-2000	
		PT 951466 E 09-04-2009	
		SI 0951466 T1 31-10-2009	
		TR 9901343 T2 21-09-1999	
		TW 568914 B 01-01-2004	
		WO 9828268 A2 02-07-1998	
		ZA 9711537 A 25-06-1998	
WO 2011060051	A1	19-05-2011	US 2011178046 A1 21-07-2011
			WO 2011060051 A1 19-05-2011

**COMPUESTO INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA TRAYECTORIA
NOTCH**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La señalización Notch es una trayectoria conservada evolucionaria que juega un papel integral en el desarrollo y homeostasis de tejido en mamíferos. Los receptores Notch y ligandos contienen dominios de la transmembrana de paso único, son expresados en la superficie celular y, por tal
10 razón, la señalización Notch es particularmente importante en la mediación de la comunicación entre células adyacentes que expresan los receptores y ligandos. Existen cuatro receptores Notch conocidos encontrados en roedores y humanos, llamados Notch 1 a Notch 4. Los receptores Notch son proteínas
15 heterodiméricas compuestas de dominios extracelulares e intracelulares que son inicialmente sintetizados como un polipéptidos único. La interacción receptor-ligando activa una serie de desdoblamiento proteolíticos del polipéptido del receptor Notch en el cual la actividad de γ -secretasa
20 está involucrada. La actividad de γ -secretasa desdobla el dominio intracelular Notch a partir de la superficie celular la cual transloca al núcleo para formar un complejo del factor de transcripción. El dominio intracelular Notch (NICD) es la forma activa de la proteína. Varias funciones de
25 señalización notch incluyen proliferación, diferenciación,

apoptosis, angiogénesis, migración y auto-renovación. Estos papeles diversos de señalización Notch durante el desarrollo y mantenimiento de tejidos normales son aberrantemente activados en diferentes formas de cáncer. Las funciones
5 oncogénicas de señalización Notch incluyen la inhibición de apoptosis y la promoción de proliferación celular.

La γ -secretasa juega un papel central en la cascada de activación Notch. Como un resultado, inhibidores de γ -secretasa han sido activamente investigados por su potencial
10 para bloquear la activación del receptor Notch. Los compuestos ejemplificados en el documento WO 98/28268 tales como 7C-203 son representativos de tales inhibidores de γ -secretasa. Debido a la promesa, no han emergido agentes quimioterapéuticos inhibidores de Notch comerciales.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Existe una necesidad para encontrar compuestos que tengan actividad inhibidora de señalización de la trayectoria Notch. Existe además una necesidad para encontrar compuestos
20 los cuales tengan actividad inhibidora de γ -secretasa. Existe también una necesidad para encontrar compuestos que posean distintas características estructurales que puedan contribuir a la actividad de inhibición de señalización de la trayectoria Notch. Existe una necesidad adicional para
25 encontrar compuestos que demuestren actividad de inhibición

de señalización de la trayectoria Notch y deseables propiedades de distribución, metabolismo y excreción *in vivo*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 es un patrón de difracción en polvo de rayos-X representativo para el compuesto del Ejemplo 2.

10

15

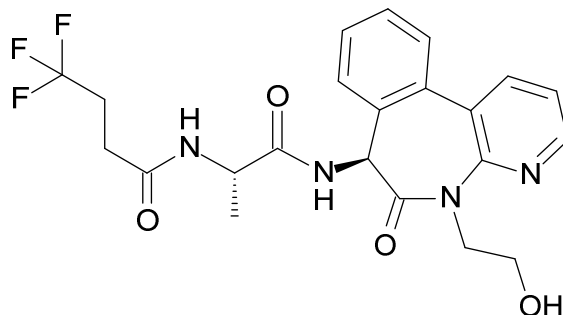
20

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Un aspecto de la invención es proporcionar un compuesto inhibidor de la señalización Notch de la estructura:

5



10

Compuesto 1

o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hidroxietyl)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida,

o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad particular, la composición farmacéutica comprende 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2[[[(7S)-5-(2-hidroxietyl)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzoazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros

ingredientes terapéuticos.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un método para inhibir la señalización Notch en un paciente con cáncer en necesidad del mismo, que comprende
5 administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de, 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, al paciente.

10 Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar un cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer
15 de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel o meduloblastoma en un paciente que comprende administrar al
20 paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

25 Un quinto aspecto de la presente invención

proporciona un método para tratar un cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, 5 cáncer pancreático, glioblastoma o cáncer colorrectal en un paciente que comprende administrar al paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo 10 farmacéuticamente aceptable.

Un sexto aspecto de la presente invención proporciona a compuesto 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7- 15 il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en terapia.

Un séptimo aspecto de la presente invención proporciona a compuesto 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7- 20 il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de un cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica, 25 eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma,

cáncer de pulmón, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel o meduloblastoma.

5 Un octavo aspecto de la presente invención proporciona a compuesto 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en el
10 tratamiento de un cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer pancreático, glioblastoma o cáncer colorrectal.

15 Un noveno aspecto de la presente invención proporciona el uso de un compuesto 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para la
20 manufactura de un medicamento para el tratamiento de un cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer
25 pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de

cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel o meduloblastoma.

Un décimo aspecto de la presente invención
5 proporciona el uso de un compuesto 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-
[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-
7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o
hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para la
manufactura de un medicamento para el tratamiento de un
10 cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T,
leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa crónica,
eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma,
cáncer pancreático, glioblastoma o cáncer colorrectal.

El término "paciente" significa mamífero y
15 "mamífero" incluye, pero no se limita a, un humano.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad
efectiva" significa la dosificación del compuesto, o sal o
hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, o composición
farmacéutica que contiene el compuesto, o sal o hidrato del
20 mismo farmacéuticamente aceptable, necesario para inhibir la
señalización Notch en un paciente con cáncer, y ya sea
destruir las células cancerígenas objetivo o reducir o
detener el progreso del cáncer en un paciente. Dosificaciones
anticipadas del Compuesto 1 o una sal o hidrato del mismo
25 farmacéuticamente aceptable están en el intervalo de 0.1

hasta 200 mg/paciente/día. Dosificaciones preferidas son anticipadas para estar en el intervalo de 1 hasta 175 mg/paciente/día. Dosificaciones más preferidas son anticipadas para estar en el intervalo de 5 hasta 150 mg/paciente/día. La dosificación exacta requerida para tratar un paciente y la longitud del tiempo de tratamiento serán determinadas por un especialista en vista de la etapa y severidad de la enfermedad así como también las necesidades específicas y respuesta del paciente individual. Aunque se expresa como dosificación en una base por día, el régimen de dosificación puede ser ajustado para proporcionar un beneficio terapéutico más óptimo a un paciente y administrar y aliviar la enteropatía mucoide (hipersecreción y acumulación de moco en el tracto gastrointestinal). Además de la dosificación diaria, dosificando cada dos días (Q2D); cada tercer día durante un periodo de cinco días seguido por dos días sin dosificación (T.I.W.); o cada tercer día (Q3D) puede ser apropiado. Un régimen de dosificación de cada dos días, T.I.W., o cada tercer día es preferido junto con la administración (pre-, concomitante o post-administración del Compuesto 1 de dexametasona para administrar o aliviar la enteropatía mucoide.

Los términos "tratamiento", "trata", y "tratar", significan incluir el aspecto completo de intervención para el cáncer a partir del cual el paciente está sufriendo, tal

como administración del compuesto activo para aliviar o reducir o invertir uno o más de los síntomas y retardar el progreso del cáncer aún si el cáncer no es actualmente eliminado. El paciente a ser tratado es un mamífero, en particular un ser humano.

El compuesto de la presente invención es preferiblemente formulado como una composición farmacéutica usando un portador farmacéuticamente aceptable y administrado por una variedad de rutas. Preferiblemente, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, *et al.*, eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995). En una modalidad particular, la composición farmacéutica comprende 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzoazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos particularmente para tratamiento de cáncer en general o un tipo de cáncer específico.

El compuesto de la presente invención es capaz de reaccionar con un número de ácidos orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente

aceptable. Tales sales farmacéuticamente aceptables y metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, 5 (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts, " *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977.

El Compuesto 1, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, pueden ser preparados por una 10 variedad de procesos conocidos en la técnica, así como también aquellos descritos abajo. Las etapas científicas específicas pueden ser combinadas en diferentes formas para preparar el Compuesto 1, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

15 El Compuesto 1 es nombrado: 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida; y también puede ser nombrado: N-[(1S)-2-[[[(7S)-6,7-dihidro-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-5H-pirido[3,2-a][3]benzazepin-7- 20 il]amino]-1-metil-2-oxoetil]-4,4,4-trifluorobutanamida; y otros nombres también pueden ser usados para identificar inequívocamente el Compuesto 1.

Se entenderá que el Compuesto 1 es representado como un estereoisómero único. Existen dos centros quirales 25 que dan origen a cuatro estereoisómeros. Como se usa en la

presente, referencias al Compuesto 1 están significando incluir también mezclas racémicas que incluyen el Compuesto 1. En la presente, las designaciones Cahn-Ingold-Prelog de (R)- y (S)- se usan para referirse a isómeros específicos. Se pueden preparar estereoisómeros específicos por síntesis estereoespecífica usando materiales de partida enantioméricamente puros o enriquecidos. Los estereoisómeros específicos de ya sea materiales de partida, intermediarios, o mezclas racémicas que incluyen el Compuesto 1 pueden ser resueltos por técnicas bien conocidas en el arte, tales como aquellas encontradas en Stereochemistry of Organic Compuestos, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) y Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), que incluyen cromatografía en fases estacionarias quirales, resoluciones enzimáticas, o cristalización fraccional o cromatografía de diastereómeros formados para tal propósito, tales como sales diastereoméricas. Mientras todas las mezclas que contienen el compuesto de la presente invención están contempladas dentro de la presente invención, la modalidad preferida es el Compuesto 1.

También se ha encontrado que el Compuesto 1 existe como atropisómeros, o confórmeros específicos. En soluciones acuosas, 8-9% de atropisómero 2 (atropisómero menor) se detecta por ^1H NMR y LC-MS en equilibrio con atropisómero 1

(atropisómero principal) a temperatura ambiente después de 24 horas. En solventes orgánicos, a temperatura ambiente después de 24 horas, aproximadamente 1-2% de atropisómero 2 se detecta por ^1H NMR y LC-MS en equilibrio con el atropisómero 1. Aunque detectable por análisis de ^1H NMR y LC-MS, el atropisómero 2 no es aislable.

Los compuestos empleados como materiales de partida iniciales en la síntesis del compuesto de la presente invención son bien conocidos y, en la magnitud que no son comercialmente disponibles, son fácilmente sintetizados usando referencias específicas proporcionadas, por procedimientos estándares comúnmente empleados por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica o se encuentran en textos de referencia generales.

Ejemplos de procedimientos y métodos comunes incluyen aquellos descritos en textos de referencia generales tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5th Edition, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4th Edition, Part B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, etc., y referencias citadas en esta.

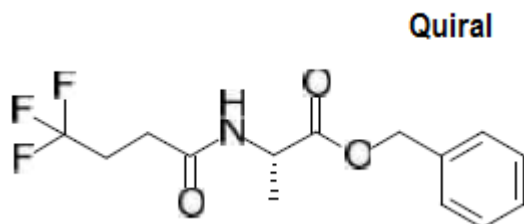
Los intermediarios y el Compuesto 1 son nombrados usando un Programa Drawing SymaxDraw versión 3.2, a partir de las estructuras, como el nombre IUPAC aplicado de manera consistente.

5

Preparación 1

(2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoato de bencilo

10



Se agregó sucesivamente clorhidrato de éster bencílico de L-alanina (7.00 g, 32.5 mmol), diisopropiletilamina (28.30 mL, 162.3 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (7.46 g, 48.7 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (9.33 g 48.7 mmol) a una solución de ácido 4,4,4-trifluorobutírico (7.131 g, 48.7 mmol) en diclorometano (162 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y agitó por 20 horas. Se agregó una solución acuosa al 20% de ácido cítrico (150 mL, 162 mmol), se agitó la mezcla por 5 minutos y se separaron las capas. Se extrajo de lo acuoso con diclorometano (100 mL). Se lavaron los orgánicos combinados con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (150 mL), secaron sobre sulfato de sodio

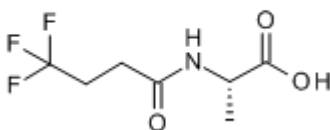
y concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea, eluyendo con hexano:acetato de etilo (4:1 a 2:1) para dar el compuesto del título como un sólido blanco (9.22 g, 30.4 mmol, 94%). MS (m/z):304(M+1); $[\alpha]_{\text{Na}^{25}} = -44.6^\circ$ (c=5.0, metanol).

Preparación 2

ácido (2S)-2-(4,4,4-Trifluorobutanoilamino)propanoico

10

Quiral

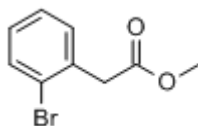


Se agregó paladio/carbono (5%, 1.76 g, 0.8 mmol) en una porción a una solución de (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoato de bencilo (8.80 g, 29 mmol) en metanol (88 mL) a temperatura ambiente. La mezcla se desgasificó (vacío/nitrógeno), llenó con hidrógeno (una atmósfera) y agitó bajo hidrógeno (29 mmol) por 5 horas. Se filtró a través de Celite®, se enjuagó la torta de filtro con metanol y concentró lo filtrado para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (6.11g, 28.7 mmol, 99%). MS (m/z):214 (M+1); $[\alpha]_{\text{Na}^{25}} = -24.7^\circ$ (c=5.0, metanol).

25

Preparación 3

2-(2-bromofenil)acetato de Metilo



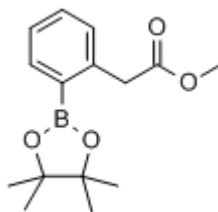
5

Se agregó dimetilformamida (2.1mL, 27.3 mmol) seguido por cloruro de tionilo (52.3 mL, 717.8 mmol) durante 7 minutos a una solución de ácido 2-bromofenilacético (150.0 g, 683.6 mmol) en diclorometano (1.50 L) se enfrió con un baño de agua a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla por 5 horas, se agregó metanol (41.5 mL, 1.0 mol) durante 5 minutos. Se burbujeó nitrógeno a través de la solución durante la noche. Se concentró para obtener el compuesto del título como un aceite incoloro en rendimiento cuantitativo (166.0 g, 724.7 mmol). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7.57 (d, J= 7.9 Hz, 1H), 7.30–7.26 (m, 2H), 7.19–7.12 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.72 (s, 3H).

15

Preparación 4

2-[2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de metilo



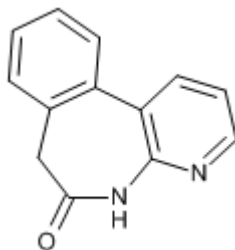
25

Se desgasificó una suspensión de 2-(2-bromofenil)acetato de metilo (156.6 g, 684 mmol), bis(pinacolato)diboro (194.9 g, 752 mmol), y acetato de potasio (135.6 g, 1.4 mol) en N-metilpirrolidona (940 mL) con
5 tres ciclos de vacío/nitrógeno. Se agregó cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio(II) (11.4 g, 13.7 mmol) y calentó a 80°C. Después de 15 horas se agregó cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paladio(II) (11.4 g, 13.7 mmol) y agitó a 90 °C por 24 horas. Se enfrió a temperatura
10 ambiente y vertió sobre una mezcla de hielo y agua (3 L), se agregó y metil butiléter terciario (1 L). Se agitó la mezcla, se filtró a través de una almohadilla de Celite® y se separaron las capas. Se extrajo de lo acuoso con metil butiléter terciario (2x500 mL). Se lavaron los orgánicos
15 combinados con agua (2x500 mL), salmuera (500 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea, eluyendo con hexano:acetato de etilo (9:1) para dar el compuesto del título como un sólido blanco (160.6 g, 581.6 mmol, 85%). MS
20 (m/z):277(M+1).

Preparación 5

5,7-Dihidropirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona

5



Se agregó carbonato de potasio (235.7 g, 1.71 mol) a una solución de 2-amino-3-bromopiridina (88.5 g, 511.7 mmol) en 1,4-dioxano (550 mL) y agua (550 mL). La mezcla se

10 desgasificó con tres ciclos de vacío/nitrógeno, se agregó acetato de paladio (II) (6.4 g, 28.4 mmol) y tetrafluoroborato de tri-*t*-butilfosfonio (16.5 g, 56.9 mmol) y agitó bajo nitrógeno a 88°C. Se agregó una solución de 2-

15 [2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de metilo (157.0 g, 568.5 mmol) en 1,4-dioxano (550 mL) por goteo durante tres minutos y agitó la mezcla a 88°C por 20 minutos. Se enfrió la mezcla a 50°C, se agregó agua (100 mL), y se separaron las capas. Se extrajo de lo acuoso con acetato de etilo (2x100 mL), se secaron los orgánicos combinados

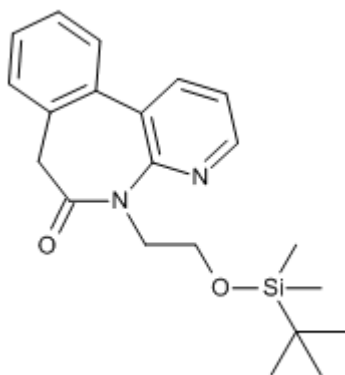
20 sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se disolvió el material concentrado en *N*-metilpirrolidona (314 mL), se enfrió en un baño de hielo y se agregó ácido sulfúrico (314 mL, 5.9 mol) por goteo para mantener una temperatura de aproximadamente 45°C. Se agitó la mezcla a 140°C por 90

25 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente, se agregó hielo (4

kg) y basificó con adición por porciones de 50% de solución acuosa de NaOH hasta que la solución es de pH 7-8. Se enfrió la suspensión a 10-15°C, se filtraron los sólidos y lavaron con agua (2 L), hexanos (1 L) y metil butiléter terciario (1 L). Se secó bajo vacío a 40°C. Se trató el material con mezcla a reflujo de solución de metanol/diclorometano al 10% y filtró caliente (x4). Se concentraron los filtrados combinados para proporcionar el compuesto del título como un sólido ligeramente marrón (85 g, 404.3 mmol, 71%). MS (m/z): 211 (M+1).

Preparación 6

5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona



Se agregó carbonato de cesio (186.6 g, 572.7 mmol), (2-bromoethoxy)-terc-butildimetilsilano (88.0 mL, 409.1 mmol), y yoduro de sodio (6.1 g, 40.9 mmol) a una suspensión de 5,7-dihidropirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (86.0 g, 409.1 mmol) en dimetilformamida (860 mL) y agitó a 70°C por 20

horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente, vertió sobre hielo y agua (100 mL), se agregó acetato de etilo (200 mL). Se filtró la mezcla a través de Celite®, después se lavó con acetato de etilo (100 mL). Se separaron las capas del filtrado, se extrajo de lo acuoso con acetato de etilo (2x50 mL). Se lavaron los orgánicos combinados con agua (2x100 mL), salmuera (100 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se disolvió material en tetrahidrofurano (1.28 L), se agregó depurador de paladio unido a Silia® (16.7 g) y agitó a temperatura ambiente por 20 horas. Se filtró a través de una almohadilla de sílice, se lavó con tetrahidrofurano (200 mL) y se concentró para obtener el compuesto del título (155 g, 420.6 mmol) como un aceite ligeramente marrón que cristaliza en rendimiento cuantitativo. MS (m/z):369(M+1).

15

Método 2:

Se calentó una mezcla de 5,7-dihidropirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (22.5 g, 106.9 mmol) y dimetilformamida (500 mL) a 100°C por 5 minutos. Se enfrió a 40°C, se agregó carbonato de cesio (104.3 g, 320.1 mmol) y (2-bromoethoxi)-terc-butildimetilsilano (29.9 mL, 138.9 mmol) y agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se calentó a 60°C por aproximadamente 2 horas, y después se enfrió a temperatura ambiente. El residuo se dividió entre acetato de etilo (1 L) y agua (3 L), nuevamente se extrajo de la capa acuosa con

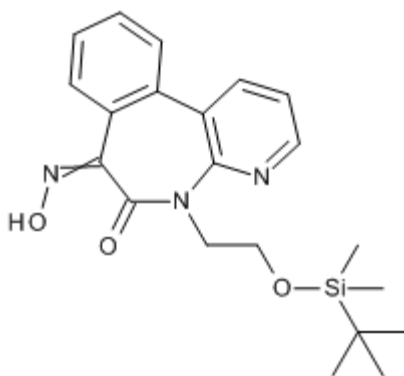
25

acetato de etilo (2x500 mL), se lavaron los orgánicos combinados con salmuera (2x500 mL). Se secaron los orgánicos combinados sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea, eluyendo
 5 con acetato de etilo:hexano (0:100 a 100:0) para dar el compuesto del título como un aceite (39.4 g, 106.9 mmol, 89%). MS (m/z):369(M+1).

Preparación 7

10 5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7-
 hidroxiiimino-pirido[2,3-d][3]benzazepin-
 6-ona

15



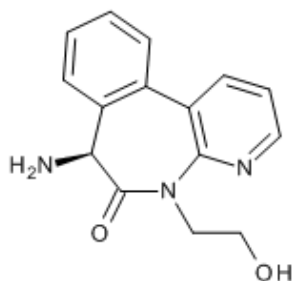
Se agregó 2-metilpropan-2-olato de potasio (66.1 g,
 20 588.8 mmol) a una solución de 5-[2-(terc-
 butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-
 ona (155.0 g, 420.6 mmol) en tetrahidrofurano (1.6 L) a -5°C
 y agitó por 10 minutos. Se agregó nitrito de isoamilo (61.9
 mL, 462.6 mmol) por goteo a -5°C y se agitó la mezcla por 10
 25 minutos. Vertió sobre hielo/agua (2 L) y extrajo con acetato

de etilo (3x200 mL). Se lavaron los orgánicos combinados con salmuera (200 mL), se secaron sobre sulfato de sodio. Se agregó tolueno (1 L) y se concentró (x3) para obtener el compuesto del título como un aceite marrón espeso (160.0 g, 402.5 mmol, 96%). MS (m/z):398(M+1).

Preparación 8

(7S)-7-Amino-5-(2-hidroxietil)-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona

Quiral

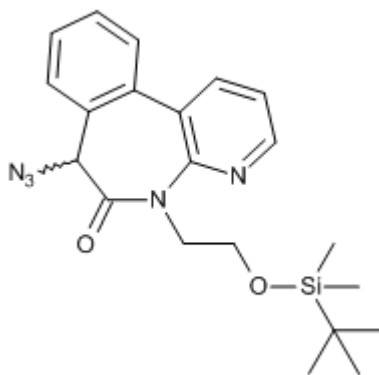


Se agregó ácido trifluoroacético (124.0 mL, 1.64 mol) en varias porciones a una solución de 5-[2-(terc-butyl(dimetil)silil)oxietil]-7-hidroxiimino-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (155.0 g, 389.9 mmol) en una mezcla de diclorometano (620 mL) y metanol (310 mL) en un baño de agua a temperatura ambiente. Se agregó zinc (76.5 g, 1.2 mol) en varias porciones de manera que la temperatura interna se mantuvo a 33-38°C. Se agitó por 15 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla a través de Celite®, se lavó con 10% metanol/diclorometano (100 mL) y concentró lo filtrado. Se agregó diclorometano (0.5 L) y hielo (500 g),

agitó y basificó con una solución acuosa al 50% de NaOH. Se filtraron los sólidos, se separaron las capas de filtrado. Se extrajo de lo acuoso con diclorometano (2x100 mL), y se concentraron los orgánicos combinados. Los sólidos se formaron en suspensión en hexano, y después filtraron y se secaron bajo alto vacío para obtener el racemato del compuesto del título como un sólido ligeramente amarillo (74.0 g, 274.8 mmol, 71%). Se purificó el material en una columna Chiralpak® AD eluyendo con etanol (0.2% dimetilamina):acetonitrilo (0:100 a 100:0) para obtener el compuesto del título (35.0 g, 130 mmol, 33.3%) como un sólido blanco. MS (m/z):270(M+1); $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} = +187.83^\circ$ (c=6.9, metanol).

Preparación 9

7-Azido-5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona



Se lavó hidruro de potasio (aproximadamente 2 cucharadas, 35% en peso en aceite mineral) con hexanos y decantó para remover el aceite, se agregó tetrahidrofurano

(60 mL) y se enfrió a -78°C . Se secó una solución de azida de 2,4,6-tris(1-metiletil)-bencensulfonilo (37.6 g, 121.6 mmol) en tetrahidrofurano (60 mL) sobre sulfato de sodio por 45 minutos. Se decantó la solución de azida en la suspensión de hidruro de potasio durante 15 minutos. Se removió el baño frío y dejó calentar a temperatura ambiente por 45 minutos; se dejó de lado la solución seca. Se enfrió una solución de diisopropilamina (17.0 mL, 121.0 mmol) y tetrahidrofurano (50 mL) a -78°C , se agregó n-butil litio (52.1 mL, 130.3 mmol) por goteo durante 5 minutos. Se removió el baño frío y dejó calentar por 15 minutos después se enfrió nuevamente a -78°C . Se canuló en una solución a -78°C de 5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (34.3 g, 93.1 mmol) en tetrahidrofurano (400 mL) durante 5-10 minutos. Se agitó por una hora a -78°C después se removió el baño frío y dejó calentar por 15 minutos (hasta aproximadamente -45°C). Se enfrió a -78°C y se agregó la solución seca de azida de 2,4,6-tris(1-metiletil)-bencensulfonilo vía cánula durante 5-10 minutos. Se removió el baño y se dejó calentar a -5 hasta 0°C durante 1 hora. Se enfrió en un baño de hielo/agua y se agregó ácido acético (26.7 mL, 465.3 mmol) por goteo durante 13 minutos. Se dejó calentar a temperatura ambiente durante 65 minutos y apagó con solución saturada de bicarbonato de sodio (1L). Se diluyó la reacción con acetato de etilo (600 mL) y agua (2L), se

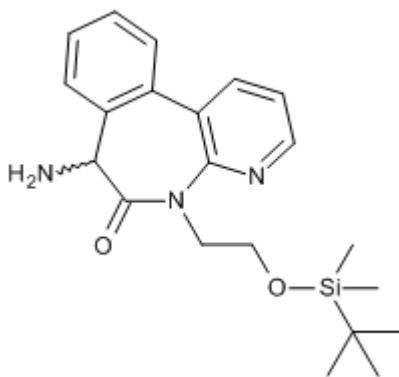
separaron las capas, nuevamente se extrajo de lo acuoso con acetato de etilo (2 X 400 mL). Se lavaron los orgánicos combinados con solución saturada acuosa de bicarbonato de sodio (500 mL) y salmuera (500 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea, eluyendo con acetato de etilo:hexano (0:100 a 100:0) para dar el compuesto del título como un aceite (39.8 g, 92.3 mmol, 99%). MS (m/z):410(M+1).

10

Preparación 10

7-Amino-5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona

15



Se agregó paladio/carbono (2.2 g, 1.0 mmol, 5% en carbono) a una solución purgada de nitrógeno de 7-azido-5-[2-(terc-butyl(dimethyl)silyl)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (39.8 g, 92.3 mmol) en etanol (923 mL). Se evacuó/llenó con hidrógeno tres veces y agitó bajo hidrógeno (una atmósfera) a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró sobre Celite®, se enjuagó con etanol y

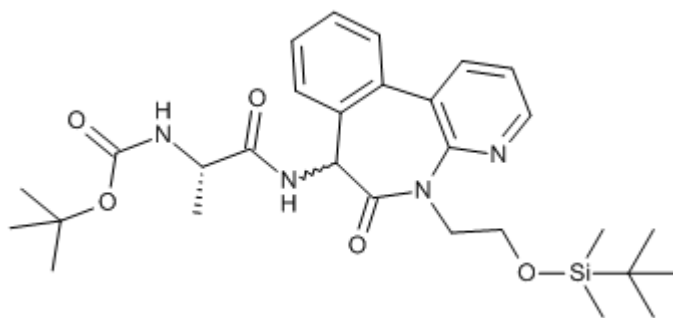
acetato de etilo y se concentró para obtener el compuesto del título como un aceite transparente (36.6 g, 89.9 mmol, 97%). MS (m/z): 384 (M+1).

5

Preparación 11

N-[(1S)-2-[[5-[2-(terc-butyl(dimetil)silil)oxietil]-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de terc-butilo

10



15

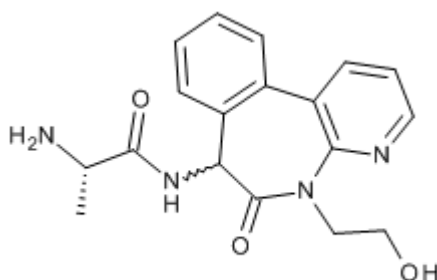
Se enfrió una mezcla de 7-amino-5-[2-(terc-butyl(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (36.3 g, 89.9 mmol), diclorometano (360 mL), trietilamina (16.3 mL, 116.9 mmol), 3-hidroxitriazolo[4,5-b]piridina (15.9 g, 116.9 mmol), y ácido (2S)-2-(terc-butoxicarbonilamino)propanoico (22.5 g, 116.9 mmol) a 0°C. Se agregó clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (22.4 g, 116.9 mmol) y después de 5 minutos se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. Se lavó con agua (500 mL x2), solución saturada acuosa de bicarbonato de sodio (2 x 300 mL), salmuera (300 mL), y

25

después se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea, eluyendo con alcohol isopropílico:hexano (5:95 a 10:90) para dar el compuesto del título como una espuma blanca (43.14 g, 77.77 mmol, 86.50%). MS (m/z):555(M+1).

Preparación 12

(2S)-2-Amino-N-[5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]propanamida

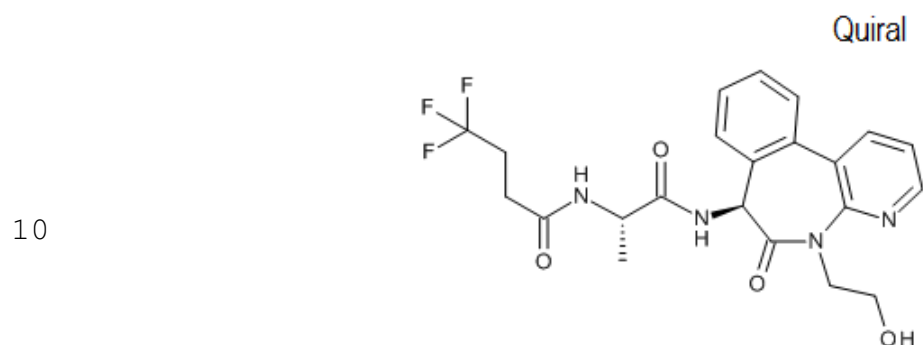


Se agregó ácido trifluoroacético (30 mL, 396.76 mmol) durante 5 minutos a una solución a 0°C de N-[(1S)-2-[[5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de terc-butilo (5.56 g, 10.0 mmol) y diclorometano (30 mL) y se dejó calentar y agitó a temperatura ambiente por 5 horas. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea vía columnas SCX® (Isolute SCX-2 x6) eluyendo con metanol seguido por acetato de etilo:metanol (amoníaco 2N) (1:1) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (3.48 g, 10.2 mmol) en rendimiento

cuantitativo. MS (m/z):341 (M+1).

Ejemplo 1

4,4,4-Trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietyl)-
5 6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il] amino]-1-metil-2-
oxo-etil]butanamida



Se agregó ácido (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoico (28.9 g, 135.7 mmol;
15 preparado sustancialmente como se describe anteriormente en la Preparación 2), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (29.7 g, 155.1 mmol) secuencialmente a una suspensión de (7S)-7-amino-5-(2-hidroxietyl)-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (34.8 g, 129.2 mmol) en diclorometano
20 (696 mL) a 0°C, agitó por 5 minutos. Se agregó monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (24.7g, 155.1 mmol), se dejó agitar por una hora, y después calentó a temperatura ambiente. Se agregó ácido (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoico (0.6 g, 2.6 mmol) y agitó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se
25 agregó agua (600 ml), filtró el sólido blanco, y se separaron

las capas del filtrado. Se lavó la capa orgánica con agua (3x200 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para proporcionar una espuma ligeramente marrón. Se formó en suspensión el material en 50% de metil butiléter terciario hexanos (500 mL), se filtraron los sólidos, se secaron bajo alto vacío para obtener 65 g de sólidos.

Se agregó agua (195 mL) y bicarbonato de potasio (14.0 g, 140.0 mmol) a una solución a 10°C de los sólidos previamente obtenidos (65.0 g, 140.0 mmol) en metanol (195 mL) y agitó a temperatura ambiente por 29 horas. Se concentró y extrajo con diclorometano (3x50 mL). Se lavaron los orgánicos combinados con agua (3x20 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea eluyendo con metanol:diclorometano (98:2, 7N en amoníaco). Se trituró el material de 50% de metil butiléter terciario/hexano, después se trituró de metil butiléter terciario (500 ml). Se lavaron los sólidos con metil butiléter terciario (200 mL) y hexano (200 mL) y se secaron los sólidos bajo alto vacío para obtener el compuesto del título como un sólido blancuzco (42.0 g, 90.4 mmol, 65%). MS (m/z):270 (M+1); $[\alpha]_{\text{Na}}^{25} = -153.40^\circ$ (c=5.0, metanol).

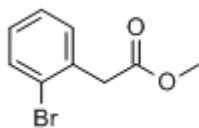
Método 2:

Se agregó clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (2.50 g, 13.0 mmol) a una mezcla a 0°C de

(2S)-2-amino-N-[5-(2-hidroxietyl)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]propanamida (3.4 g, 10.0 mmol), diclorometano (40 mL), 3-hidroxitriazolo[4,5-b]piridina (1.8 g, 13.0 mmol), ácido 4,4,4-trifluorobutanoico (1.9 g, 13.0 mmol), y trietilamina (1.8 mL, 13.0 mmol). Se dejó agitar y calentó temperatura ambiente durante la noche. Se agregó agua (40 mL) y dividió entre diclorometano (100 mL) y agua (50 mL). Se separaron las capas, nuevamente se extrajeron de lo acuoso con diclorometano, se lavaron las capas orgánicas combinadas con solución saturada acuosa de bicarbonato de sodio (2 X 100 mL). Nuevamente se extrajo de las capas de bicarbonato con diclorometano (25 mL), se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea, eluyendo con metanol (amoníaco 2N):diclorometano (0:100 a 5:95) para dar 3.77 g de la mezcla diastereomérica. Se purificó el material en una columna Chiralpak® AD eluyendo con etanol (0.2% dimetilamina):acetonitrilo (0:100 a 100:0) para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (1.7 g, 3.7 mmol, 37%). MS (m/z):465(M+1).

Preparación 13

2-(2-bromofenil)acetato de metilo



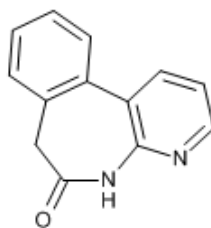
Se combinó ácido 2-bromofenilacético (500.0 g, 2.33 mol) con metanol (5.0 L) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregó ácido sulfúrico concentrado (185.8 mL) por goteo a 5 20 -35 °C, y después se calentó a 60-65 °C con agitación por 3-4 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 45°C y se concentró bajo presión reducida por debajo de 45°C a un volumen de aproximadamente 750 mL. Se enfrió la mezcla de reacción a 10-30 °C y se agregó diclorometano (2.5 L). Se 10 ajustó el pH a 7-8 con hidróxido de sodio (7%, 380.0 mL) y se separaron las capas. Se concentró la fase orgánica a sequedad bajo presión reducida por debajo de 45°C para obtener el compuesto del título (516.5 g, 97.0%) como un aceite amarillo.

15

Preparación 14

5,7-Dihidropirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona

20



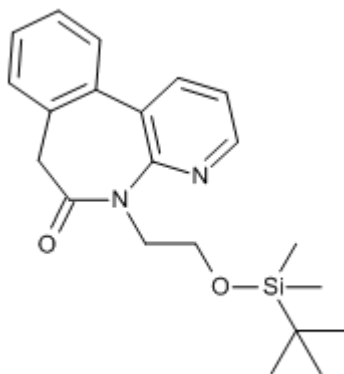
Se combinó 2-(2-bromofenil)acetato de metilo (1.0 kg, 4.36 mol), dioxano (11.0 L), y *N*-metil-2-pirrolidona (7.0 L) con agitación a temperatura ambiente. Se agregó 25 bis(pinacolato)diboro (1.2 kg, 4.58 mol) y acetato de potasio

(855.9 g, 8.72 mol) a la mezcla, y después se desgasificó la solución pasando gas de nitrógeno a través de la solución por 2-3 horas. Se cargó aducto de diclorometano de dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) (71.2 g, 97.2 mmol) bajo una atmósfera de nitrógeno y después se calentó la mezcla de reacción a 80-90 °C por 18-20 horas para obtener 2-[2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil]acetato de metilo como una solución la cual se usó sin aislamiento. Se enfrió la mezcla de reacción a 15-25 °C y se agregó 2-amino-3-bromopiridina (675.0 g, 3.90 mol) y una solución de fosfato de potasio tribásico (2.41 kg, 11.3 mol) en agua (3.0 L). Se desgasificó la solución pasando gas de nitrógeno a través de la solución por 2-3 horas, y se agregó aducto de diclorometano de dicloruro de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] paladio(II) (106.8 g, 130.8 mmol), después se calentó la mezcla de reacción a 80-90 °C por 18-40 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 50-60 °C, y se agregó lentamente una solución que consiste de bicarbonato de sodio saturado (13.0 L), cloruro de sodio saturado (13.0 L), y agua (13.0 L). Se agitó la mezcla por 2-3 horas a 50-60 °C, se enfrió a 15-25 °C y agitó por unas 18-20 horas adicionales. Se filtraron los sólidos resultantes y se lavó la torta de filtro con agua (2 x 2.0 L). Se transfirieron los sólidos a un recipiente de reacción limpio, se agregó acetato de etilo (5.0 L), y se calentó la mezcla a

60-70°C por 2-3 horas. Se enfrió la solución a 15 -25 °C y agitó por 1 -2 horas y se filtraron los sólidos resultantes. Se lavó la torta de filtro con acetato de etilo (2 x 750 mL) y se secaron los sólidos resultantes bajo vacío para proporcionar el compuesto del título (644.0 g, 68.1%) como un sólido blancuzco.

Preparación 15

5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona



Se agregó 5,7-dihidropirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (33.8 g, 0.16 mol) en acetonitrilo (340.0 mL) y agitó a 20-30 °C por 0.5-1 hora. Se agregó carbonato de cesio (104.6 g, 0.32 mol) y (2-bromoethoxy)-terc-butildimetilsilano (42.2 g, 0.18 mol) y se calentó la mezcla de reacción a 70-80 °C por 18-20 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 20-25°C y se filtró a través de tierra diatomácea (50.6 g). Se lavó la torta de filtro con acetonitrilo (2 x 50.6 mL) y concentró lo

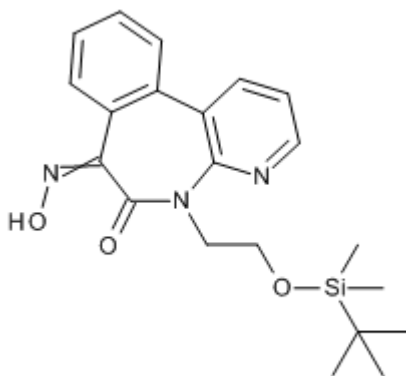
filtrado bajo presión reducida para llegar a un volumen total de aproximadamente 67.5 mL. Se agregó tolueno (152 mL), active carbono (2.53 g) y se calentó la mezcla a 60-70 °C por 1-2 horas. Se enfrió la mezcla a 25-35 °C y filtró la mezcla de reacción sobre tierra diatomácea (50.6 g). Se enjuagó la torta de filtro con tolueno (17.0 mL) y se concentró bajo presión reducida para obtener el compuesto del título como un aceite ligeramente marrón que cristaliza en reposo (56.8 g, 92.2%).

10

Preparación 16

5-[2-(terc-butyl(dimetil)silil)oxietil]-7-hidroxiimino-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona

15



20

Se combinó 5-[2-(terc-butyl(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (30.0 g, 0.08 mol) y tolueno (300.0 mL), se enfrió la mezcla de reacción a -10-0 °C. Se agregó terc-butóxido de potasio (18.2 g, 0.16 mol), nitrito de isoamilo (13.34 g, 0.11 mol) y después agitó por

25

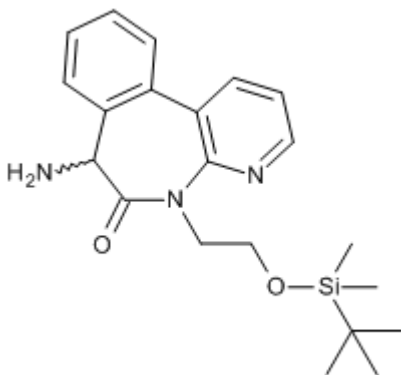
3-5 horas. Se transfirió la mezcla de reacción a una solución bifásica enfriada (0-5 °C) de acetato de etilo (210 mL) y agua (510 mL) y agitó por 15-30 minutos. Se calentó la mezcla de reacción a 15-25 °C y se separaron las capas. Se extrajo la
5 capa acuosa con acetato de etilo adicional (120 mL) y metil *terc-butyl* éter (120 mL) y se combinaron las capas orgánicas. Se concentró lo orgánico bajo presión reducida a un volumen de solución de aproximadamente 60-90 mL y después se agregó tolueno (240 mL) y acetato de etilo (75 mL). Se filtró la
10 solución a través de gel de sílice (45.0 g), se enjuagó el gel de sílice con una mezcla de tolueno (210 mL) y acetato de etilo (60 mL), y concentró lo filtrado bajo presión reducida a un volumen de aproximadamente 75 mL. Se agregó heptano (120 mL) y se concentró la mezcla a un volumen de aproximadamente
15 60 mL y se filtraron los sólidos resultantes. Se lavó la torta de filtro con heptano (25 mL) y se secó bajo vacío para proporcionar el compuesto del título (28.3 g, 72.5%) como un sólido amarillo.

20

25

Preparación 17

7-Amino-5-[2-(terc-butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-
pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona

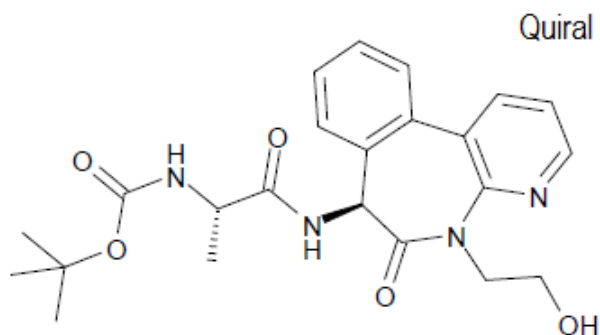


Se combinó 5-[2-(terc-butyl(dimethyl)silil)oxietil]-
7-hidroxiimino-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (206.0 g,
0.52 mol) y tetrahidrofurano (2.3 L) en una autoclave bajo
una atmósfera de nitrógeno. Se agregó níquel Raney (232.0 g,
1.13 equivalentes en p/p) a la mezcla de reacción e introdujo
atmósfera de hidrógeno (87 psi). Se agitó la mezcla de
reacción a 60-65 °C por 24 horas. Se filtró la mezcla sobre
tierra diatomácea y se lavó el auxiliar de filtro con
tetrahidrofurano (500 mL). Se concentró lo filtrado para
obtener el compuesto del título (196.0 g, 93.2%) como un
aceite marrón. MS (m/z):384 (M+1).

Preparación 18

N-[(1S)-2-[[5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de terc-butilo

5



10

Se

combinó

7-amino-5-[2-(terc-

butil(dimetil)silil)oxietil]-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-6-ona (166.0 g, 0.43 mol), diclorometano (2.2 L), y L-Boc-alanina (106.4 g, 0.56 mol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se agregó hidroxibenzotriazol (1.46 g, 10.8 mmol) y trietilamina (102.5 mL, 0.74 mol) manteniendo la temperatura interna por debajo de 30 °C. Se agregó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (128.2 g, 0.67 mol) en porciones y agitó por 16-18 horas a 20-30 °C. Se purificó la mezcla de reacción por cromatografía de gel de sílice (300 g gel de sílice), eluyendo con diclorometano (498 mLx2). Se combinó la solución de diclorometano y se lavó con agua (2 x 3.3 L). Se concentró la fase orgánica bajo presión reducida a un volumen de 300 mL a 400 mL y se agregó acetato de etilo (664.0 mL). Se concentró la mezcla bajo presión reducida a un volumen de 300-400 mL, y se agregó acetato de etilo (664 mL).

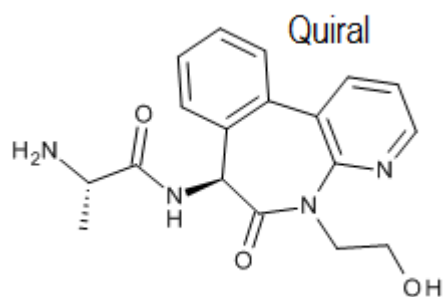
25

Se concentró la mezcla bajo presión reducida a un volumen de 300-400 mL, y se agregó acetato de etilo (1.3 L). Se agregó trihidrato de fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (149.4 g, 0.47 mol) y agitó por 16-18 horas a 20-30 °C. Se agregó una
 5 solución acuosa de cloruro de sodio (20%, 1.6 L), se separaron las capas, y se lavó la fase orgánica nuevamente con cloruro de sodio acuoso (20%, 1.6 L). Se concentró lo orgánico a un volumen aproximado de 800-900 mL y se agitó la mezcla por 12-16 horas a 20-30 °C. Se filtraron los sólidos
 10 resultantes, se lavó la torta de filtro con acetato de etilo (91.3 mL). Se purificó lo filtrado con cromatografía de gel de sílice (300 g gel de sílice), eluyendo con acetato de etilo (2 x 500 mL) para proporcionar el compuesto del título (82.6 g, 85.2% de, 100%ee, 51.2% de rendimiento) como un
 15 aceite amarillo. MS (m/z):441 (M+1).

Preparación 19

(2S)-2-Amino-N-[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]propanamida

20



25

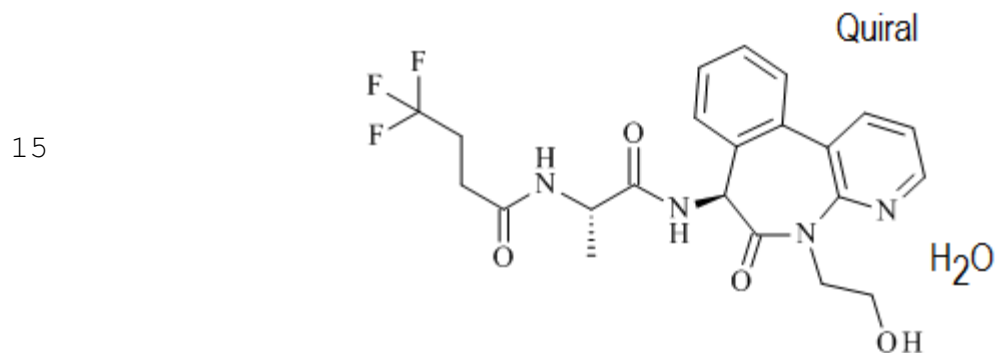
Se combinó N-[(1S)-2-[[5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-

pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de *terc-butilo* (54.0 g, 0.12 mol) y acetonitrilo (212.7 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregó ácido clorhídrico (317.5 mL, 4N, 1.27 mol) por goteo
5 para mantener la temperatura interna por debajo de 30 °C, y agitó la mezcla de reacción por 16-18 horas a 20-30 °C. Se agregó agua (324.0 mL) y diclorometano (430 mL) y se separaron las capas. Se descargó la capa orgánica y a la fase acuosa se agregó diclorometano (645 mL) y se ajustó el pH a
10 aproximadamente 10 usando hidróxido de sodio acuoso (20%, 252 mL). Se separaron las capas, se extrajo la capa acuosa con diclorometano adicional (2 x 430 mL), y se combinó la fase orgánica. Se concentró lo orgánico bajo presión reducida por debajo de 45 °C a un volumen aproximado de 130-150 mL, y se
15 agregó tetrahidrofurano (322 mL). Se concentró la solución bajo presión reducida por debajo de 45 °C a un volumen aproximado de 200-220 mL, y se agregó tetrahidrofurano adicional (213 mL). Se concentró la mezcla de reacción bajo presión reducida a un volumen aproximado de 250-270 mL, y se
20 calentó a 60-65 °C por 2-3 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 5-15 °C lentamente y agitó por 5-8 horas. Se filtraron los sólidos resultantes, se lavó la torta de filtro con acetato de etilo (56 mL). Se transfirieron los sólidos a un recipiente de reacción limpio, se agregó acetato de etilo
25 (150 mL), y se calentó a 60-65 °C por 2-3 horas, después se

enfrió la solución a 5-15 °C lentamente. Se agitó por 2-3 horas a esta temperatura y se recolectaron los sólidos suspendidos por filtración. Se lavó la torta de filtro con acetato de etilo (45 mL) y se secaron los sólidos en un horno
 5 bajo presión reducida por debajo de 60 °C para proporcionar el compuesto del título (21.0 g, 99.2%de, 100%ee, 51.0% de rendimiento) como un sólido blancuzco. MS (m/z): 341 (M+1).

Ejemplo 2

10 Hidrato de 4,4,4-Trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida



Se combinó (2S)-2-amino-N-[(7S)-5-(2-hidroxietil)-
 20 6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]propanamida (45.0 g, 132.2 mmol) y dimetilformamida (452.9 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se enfrió a 0-5 °C y se agregó N-etildiisopropilamina (77.4 mL, 444.0 mmol), ácido 4,4,4-trifluorobutírico (19.9 g, 139.3 mmol), y monohidrato de
 25 hidroxibenzotriazol (22.3 g, 153.1 mmol). Se agitó la

solución por 5-10 min y se agregó clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (30.6 g, 159.6 mmol) en una porción. Se calentó la mezcla de reacción a 20 -25 °C y agitó por 1-2 horas. Se agregó acetato de etilo (1.4 L) y agua (1.8 L) y agitó por 0.5- 1 horas. Se separaron las fases y se lavó la capa orgánica con una solución acuosa de bicarbonato de sodio (5%, 1.0 L) y se concentró la solución bajo presión reducida para obtener un volumen de 200-300 mL. Se agregó etanol (522 mL) y se concentró la solución bajo presión reducida para obtener un volumen de 200-300 mL. Se repitió tres veces. Se agregó etanol (180 mL) y 5% de solución de carbonato de potasio (34.6 mL) y agitó por 0.5-1 horas a 20~25 °C. Se agregó agua (667 mL) y cristales sembrados de hidrato de 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-hidroxietil)-6-oxo-7H-pirido[2,3-d][3]benzazepin-7-il]amino]-1-metil-2-oxo-etil]butanamida (0.4 g, 0.86 mmol) (Los cristales sembrados pueden ser generados de los sólidos obtenidos de los lotes previos del producto, o se pueden obtener usando otros métodos conocidos comunes y usados por un experto en la técnica, tales como recristalización de una pequeña alícuota) y se agitó por 2-3 horas a 20-25 °C. Se filtró y se lavó la torta de filtro con una mezcla de etanol (63 mL) y agua (42 mL) dos veces. Se secaron los sólidos resultantes en un horno bajo presión reducida por debajo de 40 °C para proporcionar el compuesto del título (41.9 g,

99.6%de, 100%ee, 65.3% de rendimiento) como un sólido blancuzco. MS (m/z):465 (M-H₂O+1).

XRPD del Ejemplo 2

5 Los patrones de XRPD de sólidos cristalinos se obtuvieron en un difractómetro de polvo de rayos-X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente CuK α (λ = 1.54060 Å) y un detector Vantec, operando a 35 kV y 50 mA. La muestra se barrió entre 4 y 40° en 2 θ , con un tamaño de etapa de 0.0087°
10 en 2 θ y una velocidad de exploración de 0.5 segundo/etapas, y con 0.6 mm de divergencia, 5.28 mm anti-dispersión fija, y ranuras detectoras de 9.5 mm. El polvo seco se envasó en un sujetador de muestra de cuarzo y se obtuvo una superficie lisa usando una laminilla de vidrio. Es bien conocido en la
15 técnica cristalográfica que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como morfología de cristal y hábito. Donde los efectos de orientación preferidos están presentes, se
20 alteran las intensidades pico, pero las posiciones pico características del polimorfo permanecen sin cambio. (Por ejemplo, véase: U. S. Pharmacopia 33 - National Formulary 28 Chapter < 941> Characterization of Crystalline Solids by X-ray Powder Diffraction (XRPD) Official October 1, 2010-
25 February 1, 2011). Además, también es bien conocido en la

técnica cristalográfica que para cualquier forma de cristal dada las posiciones pico angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad en la cual la muestra
5 es analizada, desplazamiento de muestra, o la ausencia o presencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad de posición pico de ± 0.2 en 2θ tomará en cuenta estas variaciones potenciales sin obstaculizar la identificación inequívoca de la forma de cristal indicada. La
10 confirmación de una forma de cristal puede hacerse con base en cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de $^{\circ}2\theta$), típicamente los picos más prominentes. La forma de cristal del patrón de difracción es recolectada a temperatura ambiente ($19-25^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa ($20-60\%$).

15 De este modo, una muestra preparada del compuesto del Ejemplo 2 es caracterizada por un patrón de XRPD usando radiación de $\text{CuK}\alpha$ por tener picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 abajo. La forma es cristalina y contiene picos a 22.97 grados en combinación con
20 uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 11.96 , 18.81 , 20.78 , y 21.07 grados 2-theta, con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

Tabla 1: Picos de difracción en polvo de rayos-X
del Ejemplo 2:

Pico	Ángulo (2-Theta °)	% de Intensidad
1	7.573	0.8
2	9.177	2.3
3	11.96	50.4
4	13.063	24.6
5	14.036	21.5
6	14.352	2.9
7	15.223	32.4
8	16.845	15.8
9	17.12	11.8
10	17.828	23.4
11	18.481	10.6
12	18.809	25.3
13	19.396	11.7
14	20.102	28
15	20.778	44.2
16	21.068	63.8
17	22.713	36.8
18	22.967	100
19	23.407	7.4
20	23.625	2.4
21	24.11	5.3
22	24.772	49
23	25.028	6.5
24	25.311	11.5
25	25.868	1.8
26	26.586	14.6

	27	27.979	25.6
	28	28.27	6.6
	29	29.033	3.6
	30	29.54	14.3
5	31	29.9	12.2
	32	30.556	9.9
	33	30.766	11.5
	34	31.703	1.3
	35	32.186	10.1
	36	33.015	1.4
10	37	33.822	3.4
	38	34.007	2
	39	34.451	1.1
	40	34.728	0.5
	41	35.381	2.7
	42	35.601	5.8
15	43	36.052	3.2
	44	36.272	3.5
	45	36.866	7.2
	46	37.73	0.8
	47	38.232	0.2
	48	38.608	1.2
20	49	39.139	1.5

NMR de Estado Sólido del Ejemplo 2

Se obtuvieron espectros de NMR de giro de ángulo mágico/polarización cruzada ^{13}C (CP/MAS) (NMR de estado sólido o SSNMR) usando un espectrómetro de NMR Bruker Avance
 25 II 400 MHz (Lilly etiqueta K299547) operando a una frecuencia

de carbono de 100.622 MHz y equipado con una sonda de resonancia triple Bruker 4 mm (K299551). Se usó supresión de banda lateral TOSS junto con polarización cruzada empleando desacoplamiento SPINAL64 (70.8 Watts) y un pulso CP de núcleo H conformado RAMP100. Los parámetros de adquisición son como sigue: amplitud de pulso r.f. de protón 90° de 2.5 μ s, el tiempo de contacto fue 3.5 ms, tiempo de repetición de pulso 5 s, frecuencia MAS de 10 kHz, amplitud espectral de 30 kHz, el tiempo de adquisición es 34 ms y el número de barridos es 10 10,587. Los cambios químicos son referenciados a adamantano (δ = 29.5 ppm) en un experimento separado. ^{13} C NMR (estado sólido): δ (ppm) 18.65, 27.52, 28.76, 47.66, 49.96, 55.02, 58.88, 122.87, 126.49, 129.73, 131.37, 132.31, 137.28, 145.01, 149.17, 168.53, 170.30, 175.55.

15

Titulación Karl Fischer del Ejemplo 2

Se obtuvieron titulaciones Karl Fischer usando un Coulómetro Brinkmann Methrohm 756 KF. El estándar de control se determinó usando Hydranol® como un estándar acuoso por duplicado. Se corrió la muestra por triplicado y registró el porcentaje promedio de agua para determinar la cantidad de agua en la muestra. El resultado promedio de la Titulación Karl Fischer del Ejemplo 2 es 3.9% agua. El porcentaje teórico de un equivalente molar de agua en el Ejemplo 2 es 25 3.7%.

El cáncer se reconoce cada vez más como una colección heterogénea de enfermedades cuya iniciación y progreso se inducen por la función aberrante de uno o más genes que regulan la reparación de ADN, estabilidad de
5 genoma, proliferación celular, muerte celular, adhesión, angiogénesis, invasión, y metástasis en la célula y microambientes de tejidos. La función aberrante o variante de los genes "cancerígenos" puede resultar de polimorfismo de ADN que se origina naturalmente, cambios en el número de
10 copias de genoma (a través de la amplificación, supresión, pérdida de cromosoma, o duplicación), cambios en la estructura del cromosoma y gen (a través de translocación cromosomal, inversión u otro reacomodo que conduce a expresión de gen desregulada), y mutaciones de punto. Los
15 neoplasmas cancerosos pueden ser inducidos por una función de gen aberrante, y mantenidos por la misma función de gen aberrante, o mantenimiento y progreso exacerbado por funciones de gen aberrantes adicionales.

Más allá de las aberraciones cromosomales genéticas
20 mencionadas anteriormente, cada uno de los cánceres también puede incluir modificaciones epigenéticas del genoma que incluyen metilación de ADN, impresión genómica y modificación de histona por acetilación, metilación o fosforilación. Una modificación epigenética puede jugar un papel en la inducción
25 y/o mantenimiento de la enfermedad.

Catálogos extensivos de las aberraciones citogenéticas en cáncer humano han sido compilados y se mantienen y actualizan regularmente en línea (véase The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer at the
5 US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) Web site: <http://cgap.nci.nih.gov>). La base de datos incluye aberraciones cromosomales para al menos algunos de los cánceres de la presente invención. El Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project mantiene un “Concenso
10 de Gen de Cáncer” en línea detallado de todos los genes humanos que han sido casualmente ligados a tumorigénesis (véase <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census>) así como también la base de datos COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) de mutaciones somáticas en cáncer humano
15 (véase <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Una fuente adicional que contiene información abundante en cambios citogenéticos casualmente ligados a varios cánceres es el Atlas de Genética y Citogenética en Oncología y Hematología
20 (<http://atlasgeneticsoncology.org//Anomalies/Anomliste.html#MDS>). Estas bases de datos también incluyen las aberraciones cromosomales para al menos algunos de los cánceres de la presente invención.

El diagnóstico de males cancerosos por biopsia,
25 inmunofenotipado y otras pruebas se conocen y usan de manera

rutinaria. Además de las tecnologías de imagen cromosomal
avanzadas y bandas de cromosomas de alta resolución, las
aberraciones de cromosomas en casos sospechosos de cáncer
pueden ser determinadas a través de análisis citogenético tal
5 como hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH),
kariotipado, kariotipado espectral (SKY), FISH múltiple (M-
FISH), hibridización genómica comparativa (CGH), arreglos de
polimorfismo de nucleótido único (Fragmentos SNP) y otras
pruebas de análisis y diagnóstico conocidas y usadas por
10 aquellos expertos en la técnica.

El papel oncogénico de Notch fue reportado primero
en leucemia de células-T humanas que involucra una
translocación del dominio intracelular Notch1 a la región
promotora del receptor-B de células T, que resultan en la
15 sobre expresión del dominio intracelular Notch1 (Grabher et
al. Nature Review Cancer, 2006(6):347-359; Weng et al.
Science, 2004(306):269-271). La sobre expresión del dominio
intracelular de Notch1 en células progenitoras
hematopoyéticas de ratones causa que el ratón presente
20 leucemia linfoblástica aguda de células-T similar a humanos.
Además de la leucemia linfoblástica aguda de células-T,
existe evidencia incrementada de que las señales de Notch son
oncogénicas en otros cánceres a través de mecanismos
múltiples que incluyen amplificación del receptor y sobre
25 expresión de ligandos y/o receptores que incluyen leucemia

linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica y eritroleucemia. La señalización Notch constitutiva aberrante debido a la mutación o sobre expresión de ligandos y/o receptores también está implicada en un
5 número de malignidades de tumores sólidos que incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario (Park et al. Cancer Research, 2006(66):6312-6318), melanoma (Gast et al. Genes, Chromosomes & Cancer, 2010(49):733-745), cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (Westhoff et al. PNAS,
10 2009(106):22293-22298), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel y meduloblastoma (Ranganathan et al., Nature Review Cancer, 2011(11):338-351 y
15 Supplementary information S1 (tabla)). La inhibición de la señalización Notch presenta un objetivo atractivo para proporcionar beneficios terapéuticos a pacientes con cáncer cuya enfermedad se indujo por activación aberrante de la trayectoria de señalización Notch constitutiva. Shih et al.
20 Cancer Research, 2007(67)1879-1882.

Los siguientes estudios in vitro e in vivo demuestran la actividad inhibidora de señalización de la trayectoria Notch y eficacia del Compuesto 1 contra varias líneas de células de cáncer específicas. Estos ensayos son
25 en general reconocidos por aquellos expertos en la técnica

como indicativos de actividad quimioterapéutica clínica humana. La inhibición del dominio intracelular Notch desdoblado por γ -secretasa se cree es efectivo contra cada uno de los receptores Notch 1, Notch 2, Notch 3 y Notch 4.

5 Ensayos evidencian la actividad inhibidora de la señalización de la trayectoria Notch y se puede llevar a cabo la eficacia sustancialmente como sigue o por ensayos similares que proporcionan datos similares.

10 Ensayo de Imagen Celular de Acumulación Nuclear Notch1 N1ICD

Células HEK293ΔE12 (células HEK293 son diseñadas por ingeniería para expresar establemente ADNc Notch1 de ratón que codifica para los aminoácidos 1703–2183,

15 NP_032740.3, con secuencia peptídica de señal de 23 aminoácidos, MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR (SEC ID NO:1), en su N-término) son plaqueadas a 5000 células/cavidad en una placa de 96 cavidades, incubadas en Medio Eagle Modificado de Dulbecco de alta glucosa con 5% de suero bovino fetal a 37

20 °C, 5% de CO₂ por 24 horas. Las células se trataron con el compuesto de prueba, dosificando a 10 puntos de diluciones 1:3 a través del intervalo de 1000 nM a 0.05 nM, y con una concentración final de dimetil sulfoxido (DMSO) a 0.2%. Después de 24 horas de tratamiento, las placas celulares se

25 procesaron a través de las siguientes etapas

secuencialmente: células fijas con 100µl/cavidad de fijativo
PREFER™ por 30 minutos a temperatura ambiente (RT); células
permeabilizadas con 100µl/cavidad de 0.1% TRITON® X100 en
salina amortiguada de fosfato (PBS) por 2 min a TA; se lavó 3
5 veces con 100µl/cavidad de PBS cada una; se agregó
50µl/cavidad de anticuerpo anti-N1ICD de conejo (Dominio
Intracelular Notch1), a 1:2000 en PBS con 1% de albúmina de
suero bovino e incubó 1.5 horas a 37 °C; se lavó 3 veces con
100µl/cavidad de PBS cada una; incubó con 50µl/cavidad de IgG
10 anti-conejo de cabra Alexa 488 a dilución 1:100 en PBS con 1%
de albúmina de suero bovino e incubó 1 hora a 37 °C ; se lavó
3 veces con 100µl/cavidad de PBS cada una y se agregó
100µl/cavidad de 15 µM de yoduro de propidio con 50µg/ml de
ARNase por 30 minutos para teñir el núcleo. Las placas son
15 barridas con citómetro de microplaca de fluorescencia de
barrido láser ACUMEN EXPLORER™ (TTP LABTECH LTD) para medir
el conteo nuclear celular total/cavidad y área nuclear
total/cavidad con fluorescencia a 655nm–705nm (emisión de
yoduro de propidio unido a ADN) y fluorescencia de anticuerpo
20 enlazante a N1ICD en la región nuclear a 505nm–530nm. El
rendimiento de ensayo principal es una relación de
fluorescencia total de N1ICD nuclear a área nuclear total, la
señal N1ICD nuclear normalizada. Se recolectó un perfil de
citotoxicidad relativa, como % de número celular a células de
25 control con DMS al 0.2%. El anticuerpo que reconoce el Notch1

o N1ICD desdoblado se origina a un péptido humano que corresponde con el sitio de desdoblamiento amino terminal de Notch1 humano a Val1744. En células de control no tratadas, el N1ICD generado de Notch1 se traslocará y acumulará en el núcleo. Cuando las células son tratadas por un compuesto inhibidor del desdoblamiento de Notch1 la señal del N1ICD nuclear se reducirá. La respuesta a la concentración y el IC₅₀ se determinan por fijación de curva a una logística de cuatro parámetros para la señal N1ICD nuclear, mientras el % de número celular se traza en la misma gráfica para perfil de citotoxicidad. Se realizaron los ensayos esencialmente como se describe anteriormente, el IC₅₀ promedio para el Compuesto 1 es 0.41nM (n=7). El compuesto no afecta el número de células hasta la concentración de 1000 nM.

Estos datos evidencian que el Compuesto 1 tiene afinidad para Notch1 e inhibe la acumulación intracelular del péptido de señalización celular del dominio intracelular de Notch 1.

Inhibición de Desdoblamiento de N1ICD en líneas de células tumorales humanas

Para evaluar la potencia del Compuesto 1 en su capacidad para inhibir el desdoblamiento de N1ICD, se utilizaron varias líneas de células tumorales humanas. A2780 es una línea de células de ovario humano (Sigma-Aldrich, No.

93112519); MIA PaCa-2 es una línea de células de páncreas humano (ATCC No. CRL-1420); BxPC-3 es una línea de células de páncreas humano (ATCC No. CRL-1687); SW480 es una línea de células colorrectales humanas (ATCC No. CCL-228); HCT 116 es una línea de células colorrectales humanas (ATCC No. CCL-247); DLD-1 es una línea de células colorrectales humanas (ATCC No. CCL-221); MDA-MB-231 es una línea de células de glándulas mamarias humana (ATCC No. HTB-26); U-87 MG es una línea de células de glioblastoma humano (ATCC No. HTB-14); A375 es una línea de células de melanoma maligno humano (ATCC No. CRL-1619); CCRF-CEM es una línea de células de leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana (ATCC No. CCL-119); SUP-T1 es una línea de células de leucemia linfoblástica de células-T humana (ATCC No. CRL-1942); K-562 es una línea de células de leucemia mielogenosa crónica humana (CML) caracterizada por la presencia de un transcripto de fusión comprendido de los genes Bcr y Abl1 (ATCC No. CCL-243); Jurkat, Clon E6-1 es una línea de células de leucemia de células-T aguda humana (ATCC No. TIB-152); MOLT-3 es una línea de células de leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana (ATCC No. CRL-1552); MOLT-4 es una línea de células de leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana (ATCC No. CRL-1582); HEL 92.1.7 es una línea de células de eritroleucemia humana (ATCC No. TIB-180). Cada una de las líneas celulares se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) en el número

declarado de ATCC, excepto la línea de células A2780 la cual se obtuvo de Sigma-Aldrich en el número de catálogo declarado. Las células se hicieron crecer en su respectivo medio de cultivo a 37°C en 5% de CO₂ con humedad en la atmósfera. El medio de cultivo celular para carcinoma de ovario humano A2780 es RPMI-1640 (sin rojo de fenol) con 2.05 mM de L-glutamina, se agregó 2 mM de L-glutamina, 0.01 mg/ml de insulina y 10% de suero bovino fetal (FBS); para carcinoma colorrectal humano HCT 116 es McCoy's 5A con 1.5 mM de L-glutamina, 0.075% de bicarbonato de Na y 10% de FBS; para carcinoma colorrectal humano SW480 es RPMI-1640 con 2.05 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES y 10% de FBS; glioblastoma humano U-87 MG es Solución de Sal Balanceada Earl/Medio Esencial Mínimo con 2 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1 mM de piruvato de Na, y 10% de FBS; para carcinoma pancreático humano MIA PaCa-2 es Medio Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM) sin piruvato de Na, con alta glucosa (4500 mg/ml), 4 mM de L-glutamina, 2.5% de suero de caballo y 10% de FBS; para CML DE humano K-562 es DMEM con alta glucosa (4500 mg/ml), 4 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 0.1 mM de NEAA, 1 mM de piruvato de Na y 10% de FBS; para leucemia de células T agudas humanas Clon E6-1, Jurkat, es RPMI-1640 con 2.05 mM de L-glutamina, 2.5 g/l de glucosa, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de Na, 0.075% de bicarbonato de Na y 10% de FBS; para melanoma maligno humano

A-375 y adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 es DMEM con alta glucosa (4500 mg/ml), 4 mM de L-glutamina y 10% de FBS; para adenocarcinoma pancreático humano BxPC-3, adenocarcinoma colorrectal humano DLD-1, leucemia linfoblástica humana SUP-5 T1, ALL humana MOLT-3, ALL humana Molt-4, ALL humana CCRF-CEM y eritroleucemia humana HEL 92.1.7 es RPMI-1640 con 2.05 mM de L-glutamina, 2.5 g/l de glucosa, 20 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de Na, y 10% de FBS. Cuando es 80-90% de confluencia, las células son tratadas con el compuesto, dosificando a 10 puntos de diluciones 1:3 a través del intervalo de 50 nM a 0.0025 nM, y con una concentración final de dimetil sulfóxido (DMSO) a 0.01%. Después de 24 horas de tratamiento, las placas celulares son procesadas esencialmente a través de las siguientes etapas secuencialmente: las células se recolectaron después de la tripsinización, se lavaron una vez con PBS enfriado en hielo, y sometieron a lisis en 100 µl de amortiguador de lisis XY enfriado en hielo (25 mM de Tris pH 7.5, 10 µg/ml de inhibidor de Tripsina/Quimiotripsina, 10 µg/ml de Aprotinina, 60 mM de fosfato de Beta-glicerol, 1% de Triton® X-100, 10 mM de NaF, 2.5 mM de pirofosfato, 150 mM de NaCl, 15 mM de ácido etilendiaminatetra acético (EDTA) pH 8.0, 5 mM de ácido etilen glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetra acético (EGTA) pH 8.0, 1 mM de Vanadato de Na, 10 µg/ml de Leupeptina, 1 mM de ditiotreitól, 1 µM de microcistina LR,

10 µg/ml de clorometilcetona de N-p-tosil-L-fenilalanina (TPCK), 2 mM de Clorhidrato de éster metílico de N α -p-tosil-L-arginina (TAME), 15 mM de sal de di(tris) 4-nitrofenil fosfato (PNPP), 0.1 mM de clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencensulfonilo (AEBSF), 5 mM de benzamidina, 1 µM de ácido okadaico) que contiene tableta Completa 1X (Roche Complete™ No. 11 697 498 001) y cóctel Inhibidor de Proteasa 1X (Sigma Aldrich P8340). El lisado se incubó en hielo por 15 min con breve sometimiento a vórtices cada 5 min y se sonicó por 1 minuto en hielo. Las muestras son centrifugadas en una centrífuga eppendorf a 4°C a 30,000 rpm por 30 minutos y 80 µl de sobrenadante se recolectaron para el análisis. La concentración de proteína total se determinó usando Pierce BCA Protein Assay Kit™ (Thermo Scientific, Rockford, IL) usando un lector de placa Thermomax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se determinaron los niveles de N1ICD usando un Ensayo Inmunosorbente Ligado a la Enzima N1ICD habitual (ELISA). El analito se captura en un anticuerpo monoclonal de conejo habitual específico de (Val1744) de Notch1 desdoblado y se detecta en un anticuerpo de oveja policlonal Notch1 SULFO-TAG® (Meso Scale Diagnostics, Gaithersburg, Maryland) C-terminal (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los lisados son diluidos a 1 µg/µl en amortiguador R60TX de lisis tris ELISA enfriado en hielo (Meso Scale Diagnostics, Gaithersburg, Maryland), que contiene tableta Completa 1X (Roche Complete™

mini No. 11 836 153 001) y cóctel Inhibidor de Proteasa 1X (Sigma Aldrich P8340), y se agregaron 25µl a la placa ELISA. La incubación de 25 µg de lisado de proteína se hizo a TA por una hora cada una para capturar el analito y con anticuerpo de detección. Las placas se leyeron en un Sector Imager 6000™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). El NIICD sustraído del antecedente se normaliza a la proteína total y presenta como % de inhibición con relación al grupo tratado con vehículo. El valor IC₅₀ se determina por datos de respuesta de concentración de fijación al modelo de “respuesta de dosis sigmoïdal de 4 parámetros (inclinación variable” usando el software GraphPad Prism® 4. El valor IC₅₀ para el Compuesto 1 en varias líneas de células de tumor se muestra en la Tabla 1.

15

Tabla 1

20

Líneas celulares	IC ₅₀ (nM)
A2780	1.03
MIA PaCa-2	0.71
BxPC-3	0.39
SW480	0.10
HCT 116	0.72
DLID-1	0.98
MDA-MB-231	0.50
U-87 MG	0.28

25

5

A-375	0.48
CCRF-CEM	0.76
SUP-T1	1.24
K-562	0.74
Jurkat	5.95
MOLT-3	0.61
MOLT-4	0.74
HEL 92.1.7	0.23

Los datos en la Tabla 1 evidencian la potencia del
 10 Compuesto 1 en su capacidad para inhibir la generación de
 péptido de señalización N1ICD inhibiendo la actividad de γ -
 secretasa y como un resultado de la acumulación del péptido
 de señalización N1ICD en líneas de células de tumor humano
 específicas.

15

Estudios de inhibición de objetivo y eficacia in vivo

Estudios en animales

Para evaluar la eficacia in vivo y el efecto del
 Compuesto 1 en la inhibición de la farmacodinámica de
 procesamiento (PD) de Notch, se usaron varias líneas
 20 celulares y modelos de injerto heterólogo derivados del
 paciente. Se implantaron células A2780 (2×10^6), SW480 ($6 \times$
 10^6), HCT 116 (6×10^6), U-87 MG (6×10^6), y A-375 (10×10^6)
 en una mezcla de matrigel 1:1 (0.2 ml de volumen) por
 25 inyección subcutánea en la pata trasera de ratones hembra sin

pelo atímicos de 6-8 semanas de edad (Harlan Laboratories). Se implantaron células K-562 (6×10^6) en una mezcla de matrigel 1:1 (0.2 ml de volumen) por inyección subcutánea en la pata trasera de ratones hembra n μ / μ CD1 de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratories). HEL 92.1.7 (7×10^6) en una mezcla de matrigel 1:1 (0.2 ml de volumen) se implantaron por inyección subcutánea en la pata trasera de ratones hembra deficientes inmune combinadas severamente CB17 de 6-8 semanas de edad (Taconic Farms). Se machacaron tumores derivados del paciente en piezas de 1-2 mM y mezclaron con matrigel (1:1) en 0.2 ml de volumen e implantaron por inyección subcutánea en la pata trasera de ratones hembra sin pelo atímicos de 6-8 semanas de edad (Harlan Laboratories). Los modelos de tumor derivados del paciente incluyen: glioblastoma humano (EL2144), carcinoma de cáncer ductal in vivo negativo triple humano (EL1997), y carcinoma de colon humano (EL1989, EL1986, y EL 2056) con muestras obtenidas después del consentimiento del paciente y aprobación hospitalaria del IU Health, Methodist Hospital, Indianapolis, Indiana, USA 46206. Se usaron un total de 7 a 10 ratones para cada grupo. Justo antes del implante para A2780, SW480, HEL 92.1.7, A-375, K-562, y modelos de tumores derivados del paciente, los animales son irradiados (Irradiación Corporal Total 450). Los ratones se alimentaron a *albedrío* con alimento normal. El tratamiento se inició con administración oral (forzada) de

compuesto o vehículo (Na-CMC al 1% en Tween 80 al 0.25%) en 0.2 ml de volumen cuando el tamaño de tumor alcanzó 150 ± 50 mm³. En los puntos de tiempo designados después del tratamiento, se sacrificaron los animales por asfixia con CO₂ y dislocación cervical. Los tumores se removieron y se usaron para análisis de respuesta PD. Se monitorearon el crecimiento de tumor y peso corporal durante un tiempo para evaluar la eficacia y signos de toxicidad. Las mediciones biodimensionales de tumores se realizaron dos veces a la semana y los volúmenes de tumores se calcularon en base a la siguiente fórmula: (Volumen de tumor) = $[(L) \times (W^2) \times (\pi/6)]$ en donde L es la longitud media del eje y W es el ancho medio del eje. Los datos del volumen de tumor se transformaron a una escala log para igualar la varianza a través del tiempo y grupos de tratamiento. Los datos de volumen log se analizaron con un análisis de mediciones de repetición de dos vías de varianza por un tiempo y tratamiento usando los procedimientos MIXED™ en el software SAS™ (versión 8.2). El modelo de correlación para las mediciones repetidas es energía espacial. Los grupos tratados se compararon al grupo control en cada punto de tiempo. El procedimiento MIXED™ también se usó separadamente para cada grupo de tratamiento para calcular medias ajustadas y errores estándar en cada punto de tiempo. Ambos análisis cuentan para la autocorrelación dentro de cada animal y la pérdida de datos

que ocurre cuando los animales con grandes tumores se remueven del primer estudio. Las medias ajustadas y errores estándar se grafican para cada grupo de tratamiento contra tiempo. La actividad antitumoral se expresa como porcentaje de inhibición de crecimiento del tumor (% de TGI) y se calcula comparando volumen de tumor en el grupo de tratamiento con el grupo de tratamiento del vehículo. El porcentaje de inhibición del Crecimiento del Tumor (% de TGI) y valor significativo estadístico (valor p) para el Compuesto 1 se mide esencialmente como se describe anteriormente y se resumen en la Tabla 2.

Análisis de N1ICD

Para evaluar los niveles de N1ICD en tumores, se corta aproximadamente 75 mg del tumor congelado y muele antes de la homogenización (masa actual registrada). Las muestras de tumor congeladas se transfieren a tubos Matrix-D™ para Lisis y se resuspenden en amortiguador de lisis XY enfriado en hielo (Tris 25 mM, pH 7.5, 10 µg/ml de inhibidor Trypsina/Quimotripsina, 10 µg/ml de Protinina, Fosfato beta-glicerol 60 mM, Triton ® X-100 al 1%, NaF 10 mM, pirofosfato 2.5 mM, NaCl 150 mM, ácido etilen diamina tetra acético (EDTA) 15 mM, pH 8.0, ácido etilen glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetra acético (EGTA) 5mM, pH 8.0, Vanadato Na 1 mM, 10 µg/ml de leupeptina, ditiotreitól 1 mM,

LR microcistina LR 1 μ M, 10 μ g/ml de N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), clorhidrato de éster metílico de N α -p-tosil-L-arginina (TAME) 2 mM, sal di(tris) 4-nitrofenil fosfato (PNPP) 15 mM, clorhidrato de 4-(2-aminoetil)bencensulfonil fluoruro (AEBSF) 0.1 mM, benzamida 5 mM, Ácido Okadaico 1 μ M) que contiene tableta Completa IX (Roche Complete™ No. 11697 498 001) y coctel Inhibidor de Proteasa IX (Sigma-Aldrich P8340) a una masa: relación de volumen de 75 mg/ml del amortiguador. Los tejidos se homogenizaron en un homogenizador Fast Prep FP120 (Thermo Scientific, Rockford, IL) a una velocidad de 6.0 por 30 segundos a 4°C, seguido por 15 minutos de incubación en hielo. Esto se repitió por un total de 2-3 ciclos hasta que se completó la homogenización. Los lisados se hacen girar en una centrifugadora eppendorf a 4°C a 30,000 rpm por 15 minutos para remover los desechos. Se removi6 400 μ l de lo sobrenadante y se transfiri6 a un nuevo tubo eppendorf y se sometió a un ciclo congelamiento/descongelamiento. Las muestras se hicieron girar nuevamente en una centrifugadora eppendorf a 4°C a 30,000 rpm por 30 minutos y se recolect6 120 μ l de sobrenadante para análisis. La concentración de proteína total se determin6 usando el Kit de Ensayo de Proteína Pierce BCA™ (Thermo Scientific, Rackford, IL) usando una placa lectora Thermomax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se determinaron los niveles de N1ICD usando un ELISA

N1ICD. Se capturó el analito con un anticuerpo monoclonal de conejo habitual específico a Notch1(Va11744) desdoblado y se detectó usando un anticuerpo de oveja policlonal Notch1 C-terminal SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland)(R&D Systems, Minneapolis, MN). Los lisados se diluyeron a 2 µg/ml en amortiguador de lisis tris ELISA enfriado en hielo (R60TX) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) que contiene la tableta Completa IX (Roche Complete™ mini No. 11 836 153 001) y coctel de Inhibidor de Proteasa IX (Sigma-Aldrich P8340), y se agregó 25 µl a la placa ELISA. La incubación de 50 µg de lisados de proteína se realizó a temperatura ambiente por una hora, cada una para captura del analito y con anticuerpo de detección. Las placas se leyeron en un Sector Imager 6000™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Se normalizó N1ICD sustraído antecedente a proteína total y se presentó como % de inhibición en relación al grupo tratado con el vehículo. Se midió el % de inhibición y significancia estadística de N1IDC (valor p) por el método de Dunett en tumores recolectados 4 horas después de la última dosis para el Compuesto 1, se analizó esencialmente como se describió anteriormente y se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

	Modelo de Tumor	Dosis (mg/kg)	Esquema	% de TGI (Valor p)	% de inhibición N1ICD (valor p)
5	A2780	10	Q2Dx11	56.55 (< 0.0001)	68.5 (< 0.0001)
	A2780	10	Q3Dx8	32.99 (< 0.0001)	55.3 (< 0.0001)
	A2780	3	(BID)QDx7+(BID)Q2D x7	72.35 (< 0.0001)	50.7 (0.0004)
	A2780	3	QDx21	46.60 (< 0.0001)	62.8 (< 0.0001)
10	A2780	10	Q2Dx13	51.11 (< 0.0001)	74.8 (< 0.0001)
	A2780	8	Q2Dx13	68.60 (< 0.0001)	71.7 (< 0.0001)
	A2780	7	Q2Dx13	56.95 (< 0.0001)	65.9 (< 0.0001)
	A2780	6	Q2Dx13	36.33 (< 0.05 a < 0.01)	60.7 (< 0.0001)
15	A2780	3	Q2Dx13	36.65 (< 0.05 a < 0.01)	58.6 (< 0.0001)
	A2780	1.5	QDx26	33.36 (< 0.05 a < 0.01)	59.0 (< 0.0001)
	SW480	8	(Lun, Mier, Vier)x5	61.00 (< 0.0001)	72.5 (= 0.0002)
20	HCT 116	8	(Lun, Mier, Vier)x4	37.58 (< 0.05 a < 0.01)	73.0 (= 0.0005)
	U-87 MG	8	(Lun, Mier, Vier)x4	53.33 (< 0.0001)	87.8 (< 0.0001)
	A-375	8	(Lun, Mier, Vier)x4	28.47 (NS)	77.5 (< 0.0001)

5 10	K-562	8	(Lun, Mier, Vier)x4	54.96 (< 0.01 a < 0.001)	47.6 (< 0.0001)
	HEL 92.1.7	8	Q2dx14	7.20 (NS)	56.7 (< 0.0001)
	EL1997	10 8	(Q2Dx7), 11 días de descanso, (Lun, Mier, Vier)x4	80.28 (< 0.0001)	67.9 (< 0.0001)
	EL1989	10 8	(Q2Dx7), 11 días de descanso, (Lun, Mier, Vier)x3	70.42 (< 0.0001)	79.2 (< 0.0001)
	EL2144	10	Q2Dx8	53.37 (< 0.0001)	ND*
	EL2056	8	(Lun, Mier, Vier)x5	59.05 (< 0.0001)	83.5 (< 0.0001)
	EL1986	8	(Lun, Mier, Vier)x5	62.00 (< 0.0001)	84.9 (< 0.0001)

* No determinado

15

Los datos en la tabla 2 hacen evidente la inhibición del crecimiento de tumor, y la inhibición del desdoblamiento de N1ICD por el Compuesto 1 en varios modelos de injerto heterólogo de tumores humanos. Los datos en la

20 tabla 2 además proporcionan una correlación in vivo para los datos celulares de actividad funcional descritos en la Tabla 1.

Metabolismo y Excreción

25

Los compuestos que demuestran bajo metabolismo y

modulación del Citocromo P450 (CYP450) o la falta de estos, tienen una probabilidad reducida para interacciones adversas con otras medicaciones al paciente tomando en cuenta que puede resultar en cambios de dosis o una necesidad para
5 detener la medicación en conjunto. Cuando el metabolismo CYP450 conduce a una exposición apreciable de pacientes a metabolitos activos, la eficacia y seguridad pueden surgir problemas de la mayor variabilidad asociada con la contribución de múltiples especies activas; por lo tanto,
10 generalmente se prefiere un fármaco que carece de metabolitos activos. Son deseables los agentes terapéuticos hacen evidente el bajo metabolismo o modulación de CYP450 o la falta de estos y pueden tener perfiles de seguridad superior en y para pacientes. Lynch et al., Am. Fam. Physician, 76,
15 391 (2007). El potencial para interacciones enzimáticas de CYP450 no se puede pronosticar en base únicamente a la estructura de un agente farmacéutico activo.

El compuesto 1 no es un inhibidor o inductor de las enzimas CYP450 principales y no metabolizan cualquier
20 extensión apreciable por microsomas de hígado optimizadas para metabolismo CYR450 oxidativo. En ratas y perros *in vivo*, los metabolitos oxidativos principales no se observan en circulación o excremento. Por lo tanto, el Compuesto 1 tiene una baja probabilidad para interacciones en base a CYP450 con
25 otras medicaciones que puede resultar en ajustes de dosis o

una necesidad para limitar o detener medicaciones adicionales en un paciente siendo tratado por cáncer.

El compuesto 1 se evalúa *in vivo* en ratas canuladas por el ducto biliar para farmacocinéticos de estudio
5 sistémico (PK), excreción y metabolismo. *in vivo* 51% de la dosis IV se descargó por excreción, predominantemente por orina, con baja exposición sistémica (2% del precursor) a un metabolito N-desalquilado, 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-1-metil-2-oxo-2-[[[(7S)-6-oxo-5,7-dihidropirido[2,3-d][3]benzazepin-7-
10 il]amino]etil]butanamida. Los perfiles de plasma en rata para metabolitos, indican la ausencia de metabolitos circulantes adicionales. Estudios adicionales en perros intactos de ducto biliar también soportaron la limpieza apreciable por excreción del compuesto precursor, así como también la
15 ausencia de metabolitos activos circulantes principales.

El metabolismo completo y datos de excreción para el Compuesto 1 hacen evidente los mecanismos de limpieza deseables (excreción urinaria del compuesto precursor e hidrólisis de amida para un fragmento inactivo y no
20 circulante, el cual no se forma en incubaciones con microsomas hepáticos optimizados para metabolismo de CYP450), así como también la ausencia de metabolitos circulantes activos principales.

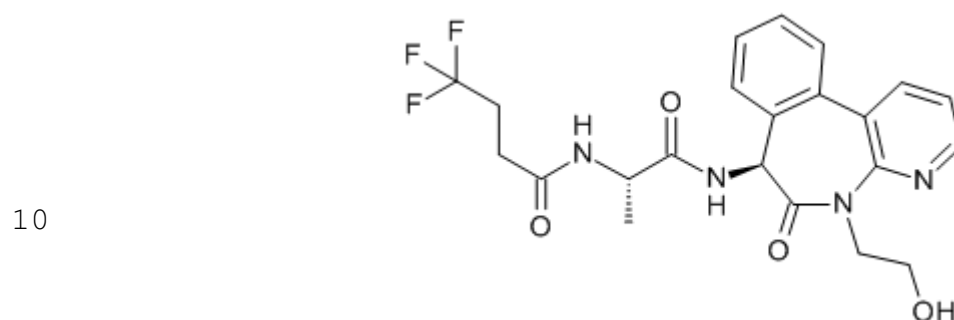
En el entorno clínico, son deseables los perfiles
25 de limpieza del Compuesto 1 preclínicos observados. Los

compuestos eliminados principalmente por metabolismos oxidativos se conocen por exhibir exposición variable debido a interacciones del fármaco con medicaciones concomitantes y ciertos jugos de fruta/hierbas, enfermedades hepáticas y diferencias entre los pacientes en actividad enzimática. Se prefieren múltiples mecanismos de limpieza, porque disminuyen el impacto de interacciones de fármaco que se origina en cualquier de alguna trayectoria de eliminación. Por lo tanto, la limpieza del Compuesto 1 para tanto excreción (51%) como metabolismo (hidrólisis de amida), sin producción de metabolitos circulantes activos principales, es ventajoso para el paciente. Todas estas propiedades de limpieza disminuyen la probabilidad para ajustes de dosis clínicas, así como minimiza la seguridad y eficacia concernientes asociadas con metabolitos circulantes activos principales, administración de medicación concomitante y diferencias entre pacientes en actividad CYP450.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

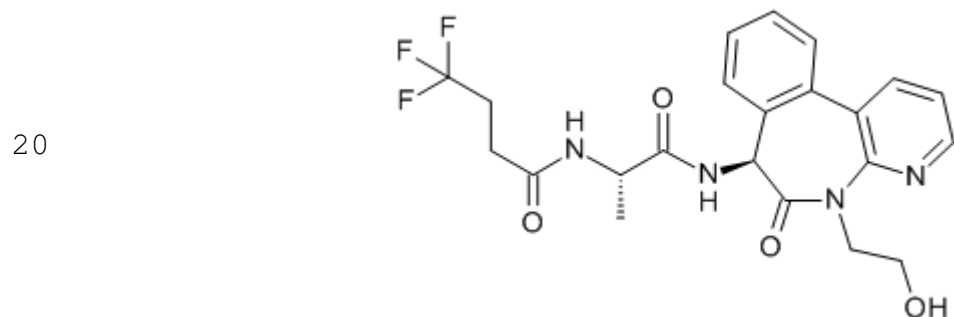
- 5 1. Un compuesto caracterizado porque es de la estructura:



Compuesto 1

o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente
15 aceptable.

2. Un compuesto caracterizado porque es de la estructura:



Compuesto 1

25 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, 2-oxo-etil]butanamida, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, en asociación con un
5 portador farmacéuticamente aceptable.

4. Un método para inhibir la señalización Notch en un paciente con cáncer en necesidad del mismo, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de conformidad con
10 la Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, al paciente.

5. Un método para tratar un cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia
15 mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel o
20 meduloblastoma en un paciente, caracterizado porque comprende administrar al paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable.

25 6. Un método para tratar un cáncer el cual es

leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer pancreático, glioblastoma o cáncer colorrectal en un
5 paciente, caracterizado porque comprende administrar al paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

7. Un compuesto de conformidad con la
10 Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en terapia.

8. Un compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de un
15 cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de
20 cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel o meduloblastoma.

9. Un compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo
25 farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de un

cáncer el cual es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer pancreático, glioblastoma o cáncer colorrectal.

5 10. Uso de un compuesto de conformidad con la
Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo
farmacéuticamente aceptable, para la manufactura de un
medicamento para el tratamiento de un cáncer el cual es
leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia
10 linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa aguda, leucemia
mielogenosa crónica, eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer
de ovario, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático,
glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello,
cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer hepático,
15 carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel o
meduloblastoma.

 11. Uso de un compuesto de conformidad con la
Reivindicación 1, o una sal o hidrato del mismo
farmacéuticamente aceptable, para la manufactura de un
20 medicamento para el tratamiento de un cáncer el cual es
leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia
linfoblástica aguda, leucemia mielogenosa crónica,
eritroleucemia, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma,
cáncer pancreático, glioblastoma o cáncer colorrectal.

25 12. Un compuesto de conformidad con la

Reivindicación 1, caracterizado porque es un hidrato cristalino distinguido por un patrón de difracción en polvo de rayos-X usando radiación $\text{CuK}\alpha$ que tiene un pico a 22.97 ± 0.2 grados 2-theta en combinación con uno o más picos a 11.96 ± 0.2 , 18.81 ± 0.2 , 20.78 ± 0.2 ó 21.07 ± 0.2 grados 2-theta a temperatura ambiente y humedad relativa.

10

15

20

25

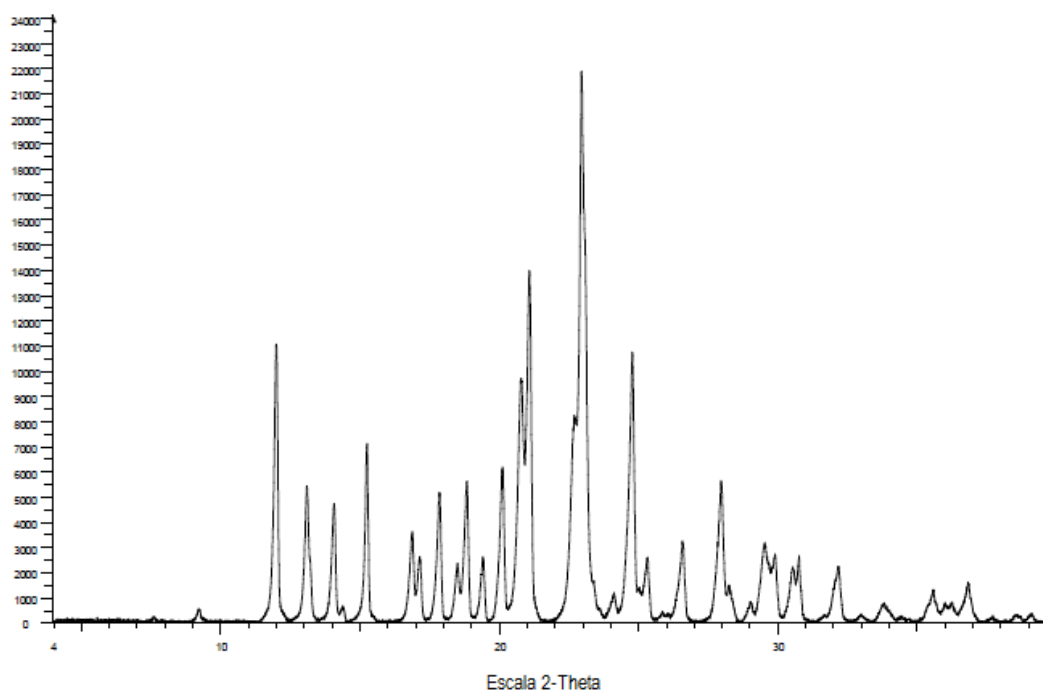
RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable, y una
5 composición farmacéutica que contiene el compuesto, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable, útil como un inhibidor de la señalización de la trayectoria Notch para el tratamiento de cáncer.

10

15

20

Fig. 1/1

X19316 WO Sequence Listing_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> Notch Pathway Signaling Inhibitor Compound

<130> X19316

<150> 61/512016

<151> 2011-07-27

<150> 61/560486

<151> 2011-11-16

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> signal peptide

<400> 1

Met Pro Arg Leu Leu Thr Pro Leu Leu Cys Leu Thr Leu Leu Pro Ala
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Gly Leu Arg
20

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X19316	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2012/047100	International filing date (<i>day/month/year</i>) 18/07/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 27/07/2011
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/047100

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☐

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/047100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K5/06 A61K38/05 C07D401/04 A61P35/00 A61P35/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/28268 A2 (ATHENA NEUROSCIENCES INC [US]; LILLY CO ELI [US]; WU JING [US]; TUNG J) 2 July 1998 (1998-07-02) cited in the application claim 90 -----	1-12
A	WO 2011/060051 A1 (UNIV MASSACHUSETTS [US]; ROSS ALONZO H [US]; GILBERT CANDACE [US]; MOS) 19 May 2011 (2011-05-19) claims 1, 7 -----	1-12
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 September 2012		Date of mailing of the international search report 19/09/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jetter, Sonya

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/047100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828268	A2	02-07-1998	AR 010854 A1 12-07-2000
			AT 421509 T 15-02-2009
			AU 749658 B2 27-06-2002
			BR 9714517 A 04-07-2000
			CA 2272305 A1 02-07-1998
			CN 1242007 A 19-01-2000
			CN 1616432 A 18-05-2005
			CO 4930282 A1 27-06-2000
			DK 0951466 T3 16-03-2009
			EP 0951466 A2 27-10-1999
			ES 2319239 T3 05-05-2009
			HR P970705 A2 31-10-1998
			HU 0001232 A2 28-10-2000
			ID 22177 A 09-09-1999
			JP 3812952 B2 23-08-2006
			JP 2000511932 A 12-09-2000
			NO 993098 A 20-08-1999
			NZ 335583 A 30-03-2001
			PL 334305 A1 14-02-2000
			PT 951466 E 09-04-2009
			SI 0951466 T1 31-10-2009
			TR 9901343 T2 21-09-1999
			TW 568914 B 01-01-2004
			WO 9828268 A2 02-07-1998
			ZA 9711537 A 25-06-1998

WO 2011060051	A1	19-05-2011	US 2011178046 A1 21-07-2011
			WO 2011060051 A1 19-05-2011
