

USO DE BIOMARCADORES EN LA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON CÁNCER QUE SERÁN SENSIBLES AL TRATAMIENTO CON UN INHIBIDOR DE PRMT5

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] Se proporcionan en la presente métodos de identificación de un paciente con una alta probabilidad de ser sensible al tratamiento con un inhibidor de proteína arginina N-metiltransferasa 5 y métodos de tratamiento del mismo.

10 ANTECEDENTES

[0002] La proteína arginina N-metiltransferasa 5 (PRMT5), también descrita como Hsl7, Jbp1, Skb1, Capsuleen o Dart5, es una de las principales metiltransferasas responsable de la mono- y dimetilación simétrica de argininas. PRMT5 pertenece a la familia de enzimas Sim Arg dimetiltransferasa. La actividad catalítica está vinculada a la activación de la ruta de impulsor de pulmón oncogénico (corte y empalme y señalización de WNT) y la regresión epigenética de supresores de tumores así como quimiocinas inmunogénicas. El nivel de proteína y la localización se correlacionan con metilación celular superior, pérdida del fenotipo epitelial bronquial y escasa progresión de la enfermedad.

[0003] La metilación postraducciona de la arginina en las proteínas de tipo histona y distintas de histona es crucial en diversos procesos biológicos, como la organización del genoma, transcripción, diferenciación, la función del complejo de corte y empalme, transducción de señales y regulación de la evolución del ciclo celular, células madre y destino de los linfocitos T. La PRMT5 de metazoos forma un complejo funcional con la proteína metilosoma 50 (MEP50) también denominada Wdr77, coactivador p44 del receptor androgénico y Valois. Tanto un nivel elevado de PRMT5-MEP50 como su acumulación citoplasmática están implicados en la tumorigénesis cancerosa y recientemente se han correlacionado con un mal desenlace clínico. Los experimentos de recuperación celular que se centran tanto en la función catalítica y de andamiaje del complejo PRMT5-MEP50,

junto con estudios enzimológicos exhaustivos han corroborado la relación oncogénica entre el nivel proteico, la localización y la función enzimática. Esta correlación convierte a PRMT5 en una diana farmacológica de molécula pequeña esencial contra cáncer y otras enfermedades.

- 5 **[0004]** PRMT5 es un miembro de la subfamilia de PRMT de tipo II que utiliza S-adenosilmetionina (SAM) para generar arginina dimetilada simétrica en los sustratos proteicos de tipo histona y distintos de histona y S-adenosilhomocisteína (SAH). La regulación de la actividad de PRMT5 se produce a través de un gran número de diferentes parejas de unión, modificaciones postraduccionales, miARN
- 10 y localización subcelular. La metilación de las histonas H2A y H4 en Arg3 y de la histona H3 en Arg8 regula la organización de la cromatina para una represión/activación específica de los transcritos génicos que participan en la diferenciación, transformación, evolución del ciclo celular y supresión tumoral. Además, la metilación mediada por PRMT5 de la histona H4 en Arg3 podría
- 15 reclutar la ADN-metiltransferasa DNMT3A con el fin de acoplar la histona y metilación del ADN para un silenciamiento génico a largo plazo.

- [0005]** La metilación de sustratos distintos de histonas puede tener lugar tanto en el citoplasma como en el núcleo dependiendo de la localización celular de PRMT5. La metilación de las proteínas Sm D1 y D3, que se requieren para el
- 20 ensamblaje del espliceosoma nuclear, tiene lugar en el citoplasma como parte del "metilosoma" que contiene PRMT5. La evidencia adicional de que PRMT5 está implicada en el corte y empalme la proporcionó la desactivación de PRMT5 condicional en células madre neurales de ratón. Las células que carecen de PRMT5 mostraron una retención selectiva de intrones y omisión de exones con
- 25 sitios donantes 5' débiles. Además de un papel en el corte y empalme, PRMT5 influye en rutas clave implicadas en la homeostasis y el destino celular mediante metilación directa de nodulos de señalización clave como p53,30 EGFR,26 CRAF,3 PI3K/AKT,64 y NFkB.

- [0006]** Ya que PRMT5 es una de las principales metiltransferasas sim-Arg y
- 30 participa en una multitud de procesos celulares, parece ser que un aumento de la expresión proteica es un factor importante en su tumorigenicidad. Resulta

interesante la aparente regulación de la traducción de PRMT5 en el linfoma de las células del manto (MCL, por sus siglas en inglés) por miARN. Aunque las células muestran menos ARNm y una velocidad de transcripción de PRMT5 menor que los linfocitos B normales, el nivel de PRMT5 y la metilación de H3R8 y H4R3
 5 aumenta significativamente. La reexpresión de miARN que se unen a la región UTR en 3' de PRMT5 disminuye el nivel de proteína PRMT5. Sorprendentemente, se ha detectado un ARN antisentido PRMT5 en el gen PRMT5 humano que refuerza la hipótesis de una regulación traduccional específica más que un nivel de expresión de ARNm elevado.

10 **[0007]** Aunque se considera sumamente PRMT5 como una diana clínica relevante, hasta la fecha se han publicado muy pocos inhibidores PRMT5 de selectivos. Recientemente, se ha descrito un inhibidor de PRMT5 potente subnanomolar novedoso (EPZ015666) con actividad antitumoral en múltiples modelos de xenoinjerto de MCL siendo la primera sonda química adecuada para
 15 la validación adicional de la biología de PRMT5 y su papel en el cáncer (Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, et al. A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. Nat Chem Biol. Junio de 2015;11(6):432-437).

[0008] El documento WO2014100695A1 divulga compuestos útiles para inhibir
 20 la actividad de PRMT5; también se describen métodos para utilizar los compuestos para tratar trastornos mediados por PRMT5.

[0009] El documento WO2014100730A1 divulga inhibidores de PRMT5 que contienen una dihidro- o tetrahidroisoquinolina y sus usos.

[0010] Devkota, K. et al., ACS Med Chem Lett, 2014. **5**: págs. 293-297, describe
 25 la síntesis de una serie de análogos del producto natural sinefungina y la capacidad de estos análogos para inhibir EHMT1 y EHMT2.

[0011] El documento WO2003070739 divulga agonistas parciales y totales de los receptores de adenosina A1, su preparación y su uso terapéutico.

[0012] El documento WO2012082436 divulga compuestos y composiciones
 30 como moduladores de metiltransferasas de histonas y para tratar enfermedades influenciadas por la modulación de la actividad metiltransferasa de histonas.

[0013] El documento WO2014100719 divulga inhibidores de PRMT5 y sus usos.

[0014] El documento WO03074083 divulga terapias combinadas que aniquilan de manera selectiva células deficientes en la metiltioadenosina-fosforilasa. En él se describen análogos de MTA como agentes que neutralizan la toxicidad.

5 **[0015]** Kung, P.-P. et al., Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**: pág. 2829-2833, describe el diseño, la síntesis y la evaluación biológica de nuevos sustratos de 5'-desoxi-5'-metiltioadenosina fosforilasa humana (MTAP).

[0016] El documento WO2012075500 divulga moduladores de tipo 7-deazapurina de la metiltransferasa de histonas.

10 **[0017]** El documento WO2014035140 divulga compuestos y composiciones para modular la actividad metiltransferasa de histonas.

[0018] El documento WO2015200680 describe inhibidores de PRMT5 y sus usos.

15 **[0019]** Los documentos WO2017/032840 y WO2017/153186 describen también inhibidores de PRMT5 y usos de los mismos y se incorporan como referencia en la presente.

20 **[0020]** PRMT5 se ha vinculado a cáncer de pulmón a través de múltiples mecanismos. La expresión elevada de PRMT5 y MEP50 en NSCLC se correlaciona sumamente con una peor supervivencia. Se mostró la perspectiva mecanística en esta elevada expresión en adenocarcinoma de pulmón mediante estudios en los que una alta expresión citoplasmática de PRMT5 se correlacionaba directamente con un mal pronóstico, posiblemente mediado a través de la transición epitelial a mesenquimatoso y la metilación de histonas. Además, la sobreexpresión de PRMT5 provoca la formación de tumores en ratones desnudos. El mecanismo detrás de las capacidades de transformación

25 celular de PRMT5 no está claro, pero se postula que tiene papeles en muerte celular, progresión del ciclo celular, corte y empalme, crecimiento celular y proliferación.

30 **[0021]** Los datos preclínicos demuestran que la inhibición de PRMT5 provoca muerte celular de cáncer de pulmón de un subconjunto de población con cáncer de pulmón mientras que diferentes subconjuntos no se ven afectados por una

exposición prolongada al inhibidor de PRMT5. Por tanto, existe la clara necesidad de biomarcadores farmacodinámicos (PD) y/o predictivos para determinar si la enfermedad mediada por PRMT5 de un paciente particular tiene una alta probabilidad de responder al tratamiento con un inhibidor de PRMT5, o para medir los efectos farmacodinámicos de un tratamiento con un inhibidor de PRMT5 en un paciente con NSCLC o SCLC u otras enfermedades mediadas por PRMT5. No se conoce actualmente ninguno de tales biomarcadores.

SUMARIO

[0022] Se divulgan en la presente métodos de identificación de un paciente que tendrá una alta probabilidad de ser sensible al tratamiento con un inhibidor de proteína arginina N-metiltransferasa 5 (PRMT5).

[0023] Los inhibidores de PRMT5 pueden unirse a la enzima PRMT5, de manera competitiva con el sustrato natural SAM (S-adenosil-L-metionina), para inhibir tal enzima .

[0024] Por tanto, se anticipa que los inhibidores de PRMT5 o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden ser útiles para el tratamiento o prevención, en particular el tratamiento, de enfermedades tales como un trastorno sanguíneo, trastornos metabólicos, trastornos autoinmunitarios, cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, pancreatitis, fallo multiorgánico, enfermedades renales, agregación de trombocitos, movilidad espermática, rechazo de trasplantes, rechazo de injertos, lesiones pulmonares y similares.

[0025] En particular, los inhibidores de PRMT5 o las composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden ser útiles para tratar o prevenir, en particular tratar, enfermedades tales como alergia, asma, cáncer hematopoyético, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma, trastorno metabólico, diabetes, obesidad, trastorno de la sangre, anemia de células falciformes, y similares.

[0026] Los inhibidores de PRMT5 o las composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden ser útiles para tratar o prevenir, en particular tratar, enfermedades tales como un trastorno proliferativo, tal como una enfermedad autoinmune, cáncer, una neoplasia benigna, o una enfermedad inflamatoria.

[0027] Los inhibidores de PRMT5 las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden ser útiles para tratar o prevenir, en particular tratar, enfermedades tales como un trastorno metabólico que comprende diabetes, obesidad; un trastorno proliferativo que comprende cáncer, cáncer hematopoyético, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma o cáncer de páncreas; trastorno sanguíneo; hemoglobinopatía; anemia falciforme; β -talasemia, una enfermedad inflamatoria y enfermedad autoinmune, por ejemplo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, diarrea, enfermedad por reflujo gastroesofágico y similares.

[0028] En algunas realizaciones, la inhibición de PRMT5 puede ser útil para tratar o prevenir, en particular tratar, la siguiente lista no limitante de cánceres: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer hematopoyético, linfoma, meduloblastoma, adenocarcinoma de recto, adenocarcinoma de colon, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, adenocarcinoma quístico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tumores cerebrales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, melanoma, oligodendroglioma, carcinoma de células claras de ovario y cistadenoma seroso ovárico.

[0029] Los ejemplos de trastornos metabólicos que pueden tratarse o prevenirse, en particular tratarse, incluyen, pero sin limitación, diabetes u obesidad.

[0030] Los ejemplos de trastornos sanguíneos que pueden tratarse o prevenirse, en particular tratarse, incluyen, pero sin limitación, hemoglobinopatía, tal como enfermedad de células falciformes o β -talasemia.

[0031] Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse o prevenirse, en particular tratarse, incluyen, pero sin limitación, neuroma acústico, adenocarcinoma, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer anal, angiosarcoma (por ejemplo, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, hemangiosarcoma), cáncer de apéndice, gammapatía monoclonal benigna, cáncer biliar (por ejemplo, colangiocarcinoma), cáncer de vejiga, cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama, carcinoma papilar de mama, cáncer de mama, carcinoma medular de la mama), cáncer cerebral (por ejemplo, meningioma; glioma, por ejemplo, astrocitoma, oligodendroglioma; meduloblastoma), cáncer de bronquio, tumor carcinoide, cáncer de cuello uterino (por ejemplo, adenocarcinoma cervical), cordoma, coriocarcinoma, craneofaringioma, cáncer

colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de recto, adenocarcinoma colorrectal), carcinoma epitelial, ependimoma, sarcoma endotelio (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, sarcoma hemorrágico idiopático múltiple), cáncer de endometrio (por ejemplo, cáncer de útero, sarcoma uterino), cáncer de esófago (por ejemplo, adenocarcinoma del esófago, adenocarcinoma de Barrett), sarcoma de Ewing, cáncer de ojo (por ejemplo, melanoma intraocular, retinoblastoma), hipereosinofilia familiar, cáncer de vejiga, cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma de estómago), tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer oral (por ejemplo, carcinoma oral de células escamosas (OSCC), cáncer de garganta (por ejemplo, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer nasofaríngeo, cáncer de la orofaringe)), cánceres hematopoyéticos (por ejemplo, leucemia, tal como la leucemia linfocítica aguda (ALL) (por ejemplo, ALL de linfocitos B, ALL de linfocitos T), leucemia mielocítica aguda (AML) (por ejemplo, AML de linfocitos B, AML de linfocitos T), leucemia mielocítica crónica (CML) (por ejemplo, CML de linfocitos B, CML de linfocitos T), y leucemia linfocítica crónica (CLL) (por ejemplo, CLL de linfocitos B, CLL de linfocitos T); linfoma tal como linfoma de Hodgkin (HL) (por ejemplo, HL de linfocitos B, HL de linfocitos T) y linfoma no Hodgkin (NHL) (por ejemplo, NHL de linfocitos B tal como linfoma difuso de células grandes (DLCL) (por ejemplo, linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL)), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de linfocitos B de la zona marginal (por ejemplo, linfomas de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), linfoma de linfocitos B de la zona marginal nodal, linfoma de linfocitos B de la zona marginal esplénica), linfoma de linfocitos B de mediastino primario, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmacítico (es decir, "Macroglobulinemia de Waldenstrom"), linfoma de células grandes inmunoblástico, leucemia de células pilosas (HCL), linfoma B-linfoblástico precursor y linfoma primario del sistema nervioso central (SNC); y NHL de linfocitos T tal como linfoma/leucemia linfoblástica T precursora, linfoma de linfocitos T periféricos (PTCL) (por ejemplo, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL) (por ejemplo, micosis fúngica, síndrome de Sezary), linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma de linfocitos T asesinos naturales extranodal, linfoma de linfocitos T tipo enteropatía, linfoma subcutáneo de linfocitos T tipo paniculitis, linfoma anaplásico de células grandes); una mezcla de una o más leucemias/linfomas como se ha descrito anteriormente; y mieloma múltiple (MM)), enfermedad de cadena pesada (por ejemplo, enfermedad de la cadena alfa, enfermedad de la cadena gamma, enfermedad de la cadena mu), hemangioblastoma, tumores miofibroblásticos inflamatorios,

- amiloidosis inmunocítica, cáncer de riñón (por ejemplo, nefroblastoma, también conocido como tumor de Wilms, carcinoma de células renales), cáncer de hígado (por ejemplo, cáncer hepatocelular (HCC), hepatoma maligno), cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico, cáncer de pulmón de células no pequeñas
- 5 (NSCLC), cáncer de pulmón escamoso (SLC), adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de Lewis, tumores neuroendocrinos de pulmón: carcinoide típico, carcinoide atípico, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), y carcinoma neuroendocrino de células grandes), leiomiosarcoma (LMS), mastocitosis (por ejemplo, mastocitosis sistémica), síndromes mielodisplásicos
- 10 (MDS), mesotelioma, trastorno mieloproliferativo (MPD) (por ejemplo, policitemia Vera (PV), trombocitosis esencial (ET), metaplasia mieloide agnogénica (AMM), también conocida como mielofibrosis (MF), mielofibrosis crónica idiopática, leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia neutrófila crónica (CNL), síndrome hipereosinofílico (HES)), neuroblastoma, neurofibroma (por ejemplo,
- 15 neurofibromatosis (NF) tipo 1 o tipo 2, schwannomatosis), cáncer neuroendocrino (por ejemplo, tumor neuroendocrino gastroenteropancreático (GEP-NET), tumor carcinoide), osteosarcoma, cáncer de ovario (por ejemplo, cistadenocarcinoma, carcinoma embrionario ovárico, adenocarcinoma de ovarios), adenocarcinoma papilar, cáncer de páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma pancreático,
- 20 neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN), tumores de células de islotes), cáncer de pene (por ejemplo, enfermedad de Paget del pene y el escroto), pinealoma, tumor neuroectodérmico primitivo (PNT), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata), cáncer de recto, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células
- 25 escamosas (SCC), queratoacantoma (KA), melanoma, carcinoma de linfocitos basales (BCC)), cáncer de intestino delgado (por ejemplo, cáncer de apéndice), sarcoma de tejido blando (por ejemplo, histiocitoma fibroso maligno (MFH), liposarcoma, tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST), condrosarcoma, fibrosarcoma, mixosarcoma), carcinoma de glándulas sebáceas,
- 30 carcinoma de glándulas sudoríparas, sinovioma, cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, carcinoma embrionario testicular), cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de la tiroides, carcinoma papilar de tiroides (PTC), cáncer de tiroides medular), cáncer de uretra, cáncer vaginal, y cáncer vulvar (por ejemplo, enfermedad de Paget de la vulva).
- 35 **[0032]** Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas que pueden tratarse o prevenirse, en particular tratarse, incluyen, pero sin limitación, enfermedad de la neurona motora, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal,

enfermedad de Pick, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con el SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atropía muscular espinal y degeneración cerebelosa.

[0033] Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares que se pueden tratar o prevenir, en particular tratar, incluyen, sin carácter limitante, la hipertrofia cardiaca, restenosis, aterosclerosis y glomerulitis.

[0034] Los ejemplos de enfermedades inflamatorias que se pueden tratar o prevenir, en particular tratar, incluyen, sin carácter limitante, la inflamación asociada con el acné, la anemia (p. ej., la anemia aplásica, anemia autoinmunitaria hemolítica), rinitis, asma, arteritis (p. ej., poliarteritis, arteritis temporal, periarteritis nodular, arteritis de Takayasu), artritis (p. ej., artritis cristalina, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis gotosa, artritis reactiva, artritis reumatoide y artritis de Reiter), enfermedad de las vías respiratorias altas, espondilitis anquilosante, amilosis, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades autoinmunitarias, alergias o reacciones alérgicas, aterosclerosis, bronquitis, bursitis, prostatitis crónica, conjuntivitis, enfermedad de Chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diverticulitis, dermatomiositis, diabetes (p. ej., diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2), una afección de la piel (p. ej., psoriasis, eczema, reacciones de hipersensibilidad del eczema, quemaduras, dermatitis, prurito (comezón)), endometriosis, síndrome de Guillain-Barré, infección, cardiopatía isquémica, enfermedad de Kawasaki, glomerulonefritis, gingivitis, hipersensibilidad, cefaleas (p. ej., jaquecas, cefaleas tensionales), oclusión intestinal (p. ej., oclusión intestinal posoperativa y oclusión intestinal durante la septicemia), púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial (síndrome de la vejiga dolorosa), trastorno gastrointestinal (p. ej., seleccionado entre úlceras pépticas, enteritis regional, diverticulitis, hemorragia gastrointestinal, trastornos gastrointestinales eosinofílicos (p. ej., esofagitis eosinofílica, gastritis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, colitis eosinofílica), gastritis, diarrea, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GORD o su sinónimo GERD), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés) (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por diversión, síndrome de Behcet, colitis indeterminada) y síndrome intestinal inflamatorio (IBS, por sus siglas en inglés)), lupus, morfea, miastenia gravis, isquemia miocárdica, esclerosis múltiple, síndrome nefrótico, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, úlceras pépticas, polimiositis, cirrosis biliar primaria, neuroinflamación asociada con trastornos cerebrales (p. ej., enfermedad

de Parkinson, enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer), prostatitis, inflamación crónica asociada con la lesión por radiación craneal, enfermedad pélvica inflamatoria, lesión por reperfusión, enteritis regional, fiebre reumática, lupus sistémico eritematoso, escleroderma, esclerodoma, sarcoidosis, espondiloartopatías, síndrome de Sjögren, tiroiditis, rechazo del trasplante, tendinitis, traumatismo o lesión (p. ej., eritema pernio, irritaciones químicas, toxinas, deformación cicatricial, quemaduras, lesión física), vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

[0035] En particular, la enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria aguda (p. ej., por ejemplo, la inflamación resultado de una infección). En particular, la enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria crónica (p. ej., afecciones que son el resultado del asma, la artritis y la enfermedad intestinal inflamatoria). Los inhibidores de PRMT5 también pueden ser útiles para tratar la inflamación asociada con un traumatismo y la mialgia no inflamatoria. Los compuestos también pueden ser útiles para tratar la inflamación asociada con el cáncer.

[0036] Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar o prevenir, en particular tratar, incluyen, sin carácter limitante, la artritis (incluida la artritis reumatoide, espondiloartopatías, artritis gotosa, enfermedades articulares degenerativas tales como la osteoartritis, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Sjogren, espondilitis anquilosante, espondilitis indiferenciada, enfermedad de Behcet, anemias autoinmunitarias hemolíticas, esclerosis lateral amiotrófica, amilosis, esclerosis múltiple, dolor agudo del hombro, artritis juvenil y psoriásica), asma, aterosclerosis, osteoporosis, bronquitis, tendinitis, bursitis, afecciones de la piel (p. ej., psoriasis, eczema, reacciones de hipersensibilidad del eczema, quemaduras, dermatitis, prurito (quemazón)), enuresis, enfermedad eosinofílica, trastorno gastrointestinal (p. ej., seleccionado entre úlceras pépticas, enteritis regional, diverticulitis, hemorragia gastrointestinal, trastornos gastrointestinales eosinofílicos (p. ej., esofagitis eosinofílica, gastritis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, colitis eosinofílica) gastritis, diarrea, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GORD o su sinónimo GERD), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por diversión, síndrome de Behcet, colitis indeterminada) y síndrome intestinal inflamatorio (IBS)) y trastornos que mejoran con un agente gastroprocinético (p. ej., oclusión intestinal, oclusión intestinal posoperativa y oclusión intestinal durante la septicemia; enfermedad por reflujo

gastroesofágico (GORD o su sinónimo GERD); esofagitis eosinofílica, gastroparesis tal como la gastroparesis diabética; intolerancias alimentarias y alergias alimentarias y otros trastornos funcionales del intestino tales como la dispepsia no ulcerosa (NUD, por sus siglas en inglés) y el dolor pectoral no cardíaco (NCCP, por sus siglas en inglés, incluida la costochondritis)).

[0037] En una realización particular, un inhibidor de PRMT5 puede ser útil en la reprogramación de células somáticas, tal como reprogramación de células somáticas en células madre. En una realización particular, un inhibidor de PRMT5 puede ser útil para desarrollar células germinales y, por lo tanto, se supone útil en las áreas de la tecnología reproductora y la medicina regenerativa.

[0038] Otras enfermedades que se pueden tratar o prevenir, en particular tratar, incluyen, sin carácter limitante, la lesión isquémica asociada con los infartos de miocardio, enfermedades inmunológicas, accidente cerebrovascular, arritmia, enfermedades hepáticas relacionadas con el alcohol o inducidas por toxinas, rinosinusitis sensible a la aspirina, fibrosis quística, cáncer oncológico y enfermedades hematológicas, por ejemplo, la anemia crónica y la anemia aplásica.

[0039] La presente invención comprende por tanto un método de identificación de un paciente que es probable que sea sensible al tratamiento con un inhibidor de proteína arginina N-metiltransferasa 5 (PRMT5) que comprende evaluar una muestra biológica del paciente para detectar la presencia de cualquiera de las siguientes:

- una mutación activante de PIC3CA,
- una alteración del espliceosoma,
- una amplificación de la ruta de ciclina D1, y/o
- una alteración de la ruta de WNT

en el que la presencia de cualquiera de dicha mutación o alteración indica una mayor probabilidad de que dicho paciente sea sensible al tratamiento con dicho inhibidor de PRMT5 que en ausencia de dicha mutación o alteración.

[0040] En una realización preferida, la alteración del espliceosoma comprende una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en U2AF1, RBM10 y KIAA1429. En una realización específica, el gen es U2AF1 y la mutación es S34F. En otra realización específica, el gen es RBM10 y la mutación se
5 selecciona del grupo que consiste en I696fs, I348N, G840fs. En aún otra realización específica, el gen es KIAA1429 y la mutación se selecciona del grupo que consiste en L837V, F1260L, D251if, T1333M, V1548L, G397A y Q962E. Otras alteraciones del espliceosoma pueden indicar también una mayor probabilidad de que el paciente sea sensible al tratamiento con un inhibidor de
10 PRMT5.

[0041] En otra realización la mutación activante de PIC3CA se selecciona del grupo que consiste en H1047R, PG106-R108del , T1025A y E542K. Sin embargo, otra mutación activante puede indicar también una mayor probabilidad de que el paciente sea sensible al tratamiento con un inhibidor de PRMT5.

15 **[0042]** En otra realización, la amplificación de la ruta de ciclina D1 es una amplificación de la ruta de ciclina D1, CDK4 o CDK6. Sin embargo, otras amplificaciones de la ruta de ciclina D1 pueden indicar también una mayor probabilidad de que el paciente sea sensible al tratamiento con un inhibidor de PRMT5.

20 **[0043]** En otra realización, la alteración de la ruta de WNT comprende señalización de WNT autocrina. Preferiblemente, la alteración de la ruta de WNT comprende una mutación en un gen de APC o CTNNB1. En una realización específica, el gen es APC y la mutación se selecciona del grupo que consiste en R213Q, R2673G, I1177M y D2796G. En otra realización específica, el gen es
25 CTNNB1 y la mutación se selecciona del grupo que consiste en Y670*, S45F y T41A. Sin embargo, otras alteraciones de la ruta de WNT pueden indicar también una mayor probabilidad de que el paciente sea sensible al tratamiento con un inhibidor de PRMT5.

[0044] en una realización particular, la mutación o alteración según la invención
30 puede comprender una alteración del espliceosoma, y el paciente tiene NSCLC.

[0045] En otra realización particular, la mutación o alteración según la invención comprende una amplificación de la ruta de ciclina D1 o una alteración de la ruta de WNT, y el paciente tiene NSCLC.

5 **[0046]** En otra realización particular, la mutación o alteración según la invención comprende una mutación activante de PIC3CA y el paciente tiene SCLC.

[0047] En una realización preferida de la invención, el inhibidor de PRMT5 es el compuesto 2 o el compuesto 80.

10 **[0048]** La presente solicitud da a conocer un vínculo de sensibilidad con mutaciones activantes de PI3K-alfa en SCLC, y en alteraciones del espliceosoma y regulación por incremento de la ruta de WNT en NSCLC. Las amplificaciones de la ruta de ciclina D1 están asociadas con la respuesta del inhibidor de PRMT5 en NSCLC.

15 **[0049]** Se proporcionan además en la presente kits y cebadores para identificar la presencia de una o más mutaciones o alteraciones descritas anteriormente en una muestra biológica.

[0050] Los métodos, kits y cebadores divulgados pueden entenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con las figuras adjuntas, que forman una parte de esta divulgación. Ha de entenderse que los métodos, kits y cebadores divulgados no se limitan a
20 los métodos, kits y cebadores específicos descritos y/o mostrados en la presente, y que la terminología usada en la presente es para el fin de describir realizaciones particulares a modo de ejemplo solo y no se pretende que sea limitativa de los métodos, kits y cebadores reivindicados.

25 **[0051]** La referencia a un valor numérico particular incluye menos ese valor particular, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Cuando se expresa un intervalo de valores, otra realización incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. Además, la referencia a valores establecidos en intervalos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese intervalo. Todos los intervalos son inclusivos y combinables.

[0052] Ha de apreciarse que determinadas características de los métodos, kits y cebadores divulgados que, por claridad, se describen en la presente en el contexto de realizaciones separadas, pueden proporcionarse también en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de los métodos, kits y cebadores dados a conocer que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, pueden proporcionarse también por separado o en cualquier subcombinación.

[0053] Tal como se usa en la presente, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen el plural.

10 **[0054]** Tal como se usa en la presente, "tratar" y términos similares se refieren a reducir la gravedad y/o frecuencia de síntomas de cáncer, eliminar síntomas de cáncer y/o la causa subyacente de dichos síntomas, reducir la frecuencia o probabilidad de síntomas de cáncer y/o su causa subyacente, y mejorar o remediar el daño provocado, directa o indirectamente, por un cáncer.

15 **[0055]** "Muestras biológicas" se refiere a cualquier muestra de un paciente en la que pueden obtenerse células cancerosas y puede aislarse ARN. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sangre, fluido de linfa, médula ósea, una muestra tumoral sólida, o cualquier combinación de los mismos.

20 **[0056]** Tal como se usa en la presente, "preamplificación" se refiere a un procedimiento de PCR que se realiza antes de la etapa de amplificación con el fin de aumentar la cantidad de ADNc de molde para la etapa de amplificación. Una etapa de preamplificación puede realizarse, por ejemplo, usando la mezcla maestra TaqMan® PreAmp (Life Technologies/Applied Biosystems® n.º de
25 producto 4391128).

[0057] Tal como se usa en la presente, "amplificación", "amplificar" y términos similares se refieren a la generación de numerosas copias idénticas de una muestra de ácido nucleico. Las técnicas adecuadas para amplificar una muestra de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). En algunas realizaciones, la etapa de amplificación comprende RT-PCR.

[0058] "Secuenciación de última generación" o "NGS" se refiere a cualquier método de secuenciación que determine la secuencia de nucleótidos de cualquier molécula de ácido nucleico individual (por ejemplo, en secuenciación de moléculas individuales) o aproximaciones expandidas clonalmente para moléculas de ácido nucleico individuales de un modo en paralelo de alto rendimiento (por ejemplo, más de 103, 104, 105 o más moléculas pueden secuenciarse simultáneamente). Las técnicas de secuenciación de última generación a modo de ejemplo secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante ligación y secuenciación mediante hibridación. Los métodos de secuenciación de última generación a modo de ejemplo incluyen secuenciación de firmas masivamente en paralelo (Lynx Therapeutics); pirosecuenciación 454 (454 Life Sciences/Roche Diagnostics); secuenciación de terminador de colorante reversible, en fase sólida (Solexa/Illumina); tecnología SOLiD (Applied Biosystems); secuenciación de semiconductor iónico (Ion Torrent); y secuenciación de nanobola de ADN (Complete Genomics). Pueden encontrarse descripciones de determinadas plataformas de NGS en la siguiente: Shendure, et al, "Next-generation DNA sequencing", Nature, 2008, vol. 26, n.º 10, 1135-1145;

Plataformas de NGS

[0059] En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento, masivamente en paralelo emplea secuenciación mediante síntesis con terminadores de colorante reversibles. En otras realizaciones, la secuenciación se realiza por medio de secuenciación mediante ligación. En aún otras realizaciones, la secuenciación es secuenciación de moléculas individuales. Los ejemplos de técnicas de secuenciación de última generación incluyen, pero no se limitan a pirosecuenciación, secuenciación con terminador de colorante reversible, secuenciación SOLiD, secuenciación de semiconductor iónico, secuenciación de molécula individual Helioscope, etc.

- [0060] El sistema de secuenciación de amplicones Ion Torrent™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) emplea un enfoque basado en flujo que detecta cambios de pH provocados por la liberación de iones de hidrógeno durante la incorporación de nucleótidos no modificados en la replicación del ADN. Para su uso con este sistema, se produce inicialmente una biblioteca de secuenciación generando fragmentos de ADN flanqueados por adaptadores de secuenciación. En algunas realizaciones, estos fragmentos pueden amplificarse clonalmente sobre partículas mediante PCR en emulsión. Las partículas con el molde amplificado se colocan entonces en un chip de secuenciación de semiconductor de silicio. Durante la replicación, el chip se inunda con un nucleótido tras otro, y si un nucleótido complementa la molécula de ADN en un micropocillo particular del chip, entonces se incorporará. Se libera de manera natural un protón cuando se incorpora un nucleótido mediante la polimerasa en la molécula de ADN, dando como resultado un cambio local detectable del pH. El pH de la disolución cambia entonces en ese pocillo y se detecta mediante el sensor iónico. Si están presentes repeticiones de homopolímero en la secuencia del molde, se incorporarán múltiples nucleótidos en un único ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados y a una señal electrónica proporcionalmente mayor.
- [0061] El sistema de secuenciación 454™ GS FLX™ (Roche, Alemania), emplea una metodología de detección basada en luz en un sistema de pirosecuenciación en paralelo a gran escala. La pirosecuenciación usa polimerización de ADN, adición de una especie de nucleótido de una vez y detección y cuantificación del número de nucleótidos añadidos a una ubicación dada a través de la luz emitida por la liberación de pirofosfatos unidos. Para su uso con el sistema 454™, se fijan fragmentos de ADN fijados a adaptador a perlas de captura de ADN en una emulsión de agua en aceite y se amplifican mediante PCR (PCR en emulsión). Cada perla unida a ADN se coloca en un pocillo en una placa de picotitulación y se suministran reactivos de secuenciación por todos los pocillos de la placa. Los cuatro nucleótidos de ADN se añaden secuencialmente en un orden fijo por toda la placa de picotitulación durante una ronda de secuenciación. Durante el flujo de nucleótidos, millones de copias de

ADN unidas a cada una de las perlas se secuencian en paralelo. Cuando se añade un nucleótido complementario a la hebra de molde a un pocillo, el nucleótido se incorpora en la hebra de ADN existente, generando una señal luminosa que se registra mediante una cámara CCD en el instrumento.

- 5 **[0062]** Tecnología de secuenciación basada en terminadores de colorante reversibles: En primer lugar, se unen moléculas de ADN a cebadores sobre un portaobjetos de modo que se formen colonias clonales locales. Se añaden cuatro tipos de bases de terminadores reversibles (bases de RT), y los nucleótidos no incorporados se eliminan por lavado. A diferencia de la pirosecuenciación, el ADN
10 solo puede extenderse un nucleótido cada vez. Una cámara toma imágenes de los nucleótidos marcados fluorescentemente, luego el colorante junto con el bloqueante en 3' terminal se elimina químicamente del ADN, permitiendo el siguiente ciclo.

- [0063]** La secuenciación de moléculas individuales de Helicos usa fragmentos
15 de ADN con adaptadores de cola de poli A añadidos, que se unen a la superficie de la célula de flujo. En cada ciclo, se añaden ADN polimerasa y una única especie de nucleótido marcado fluorescentemente, dando como resultado extensión dependiente de molde de los dúplex de cebador-molde inmovilizados en la superficie. Las lecturas se realizan mediante el secuenciador Helioscope.
20 Tras la adquisición de imágenes que rellenan la matriz completa, la escisión y liberación químicas del marcador fluorescente permite el ciclo posterior de extensión y obtención de imágenes.

- [0064]** La secuenciación mediante síntesis (SBS), como la secuenciación electroforética de terminación con colorante "del viejo estilo", se basa en la
25 incorporación de nucleótidos mediante una ADN polimerasa para determinar la secuencia de bases. Una biblioteca de ADN con adaptadores fijados se desnaturaliza en hebras individuales y se injerta en una célula de flujo, seguido por amplificación de puente para formar una matriz de alta densidad de puntos sobre un chip de vidrio. Los métodos de terminador reversible usan versiones
30 reversibles de terminadores de colorante, añadiendo un nucleótido cada vez, detectando la fluorescencia en cada posición mediante la eliminación repetida del

grupo bloqueante para permitir la polimerización de otro nucleótido. La señal de incorporación de nucleótidos puede variar con los nucleótidos marcados fluorescentemente, habiéndose usado todos de reacciones luminosas impulsadas por fosfato y detección de iones de hidrógeno. Los ejemplos de plataformas de SBS incluyen Illumina GA y HiSeq 2000. El sistema de secuenciación personal MiSeq® (Illumina, Inc.) también emplea secuenciación mediante síntesis con química de terminador reversible.

[0065] En contraposición a la secuenciación mediante el método de síntesis, la secuenciación mediante el método de ligación usa una ADN ligasa para determinar la secuencia diana. Este método de secuenciación se basa en la ligación enzimática de oligonucleótidos que son adyacentes a través de complementariedad local en una hebra de ADN de molde. Esta tecnología emplea un reparto de todos los posibles oligonucleótidos de una longitud fija, marcados según la posición secuenciada. Los oligonucleótidos se aparean y se ligan y la ligación preferente mediante ADN ligasa para hacer coincidir las secuencias da como resultado una señal de espacio de color codificada por dinucleótido en esa posición (a través de la liberación de una sonda marcada fluorescentemente que corresponde aun nucleótido conocido en una posición conocida a lo largo del oligonucleótido). Este método lo usan principalmente secuenciadores SOLiD™ de Life Technologies'. Antes de la secuenciación, el ADN se amplifica mediante PCR en emulsión. Las perlas resultantes, que contienen cada una solo copias de la misma molécula de ADN, se depositan sobre un sustrato plano sólido.

[0066] La secuenciación SMRT™ se basa en la secuenciación mediante enfoque de síntesis. El ADN se sintetiza en recipientes de tipo pocillo pequeño de guía de ondas de modo cero (ZMW) con las herramientas de captura ubicadas en el fondo del pocillo. La secuenciación se realiza con el uso de polimerasa no modificada (unida al fondo del ZMW) y nucleótidos marcados fluorescentemente que fluyen libremente en la disolución. Los pocillos se construyen de un modo que solo se detecta la fluorescencia que se produce en el fondo del pocillo. El marcador fluorescente se desprende del nucleótido al incorporarse en la hebra de ADN, dejando una hebra de ADN sin modificar.

Cebadores para amplificar mutantes

[0067] Un experto en la técnica conoce que la amplificación de ácido nucleico requiere cebadores que son complementarios, y se unen a, una región en 5' y 3' de la hebra de ácido nucleico que flanquea a la región buscada que va a amplificarse. Tal como se usa en la presente, "par de cebadores" se refiere a los cebadores directo e inverso usados en una etapa de amplificación.

[0068] El experto en la técnica puede identificar cebadores adecuados para la amplificación y detección de mutaciones particulares tal como se describió anteriormente, usando métodos conocidos.

10

Genómica y análisis

[0069] Pueden usarse genómica funcional y análisis de transcripción para analizar la amplificación de rutas y genes, usando técnicas y protocolos convencionales.

15

Inhibidores de PRMT5 para su uso en los métodos dados a conocer

[0070] En la presente se proporcionan inhibidores de PRMT5 adecuados para su uso en los métodos divulgados. En algunas realizaciones, si están presentes en la muestra una o más mutaciones o amplificaciones incluyendo una mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina D1 y/o una alteración de la ruta de WNT, el paciente puede tratarse con un inhibidor de PRMT5 dado a conocer en el documento PCT/EP2016/070097 (incorporado en la presente como referencia), incluyendo cualquier forma tautomérica o estereoquímicamente isomérica del mismo, y un *N*-óxido del mismo, sales farmacéuticamente aceptables del mismo o un solvato del mismo (también se dan a conocer grupos R adecuados en el documento PCT/EP2016/070097). En algunos aspectos, por ejemplo, el paciente puede tratarse con el compuesto 2 o el compuesto 80, incluyendo cualquier forma

tautomérica o estereoquímicamente isomérica del mismo, y un N-óxido del mismo, sales farmacéuticamente aceptables del mismo o un solvato del mismo. En algunos aspectos, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de HCl.

[0071] En algunas realizaciones, el paciente puede tratarse con un inhibidor de PRMT5 si están presentes en la muestra una o más mutaciones o amplificaciones incluyendo una mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina D1 y/o una alteración de la ruta de WNT, en el que el inhibidor de PRMT5 es un anticuerpo anti-PRMT5.

[0072] Pueden sintetizarse sales a partir de un compuesto precursor que contiene un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales, tales como los métodos descritos en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, tapa dura, 388 páginas, agosto de 2002, que se incorpora en la presente como referencia. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con la base o ácido adecuado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se usan medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los inhibidores de PRMT5 para su uso en los métodos divulgados pueden existir como mono- o di-sales dependiendo del pKa del ácido a partir del cual se forma la sal.

[0073] Pueden formarse sales de adición de ácidos con una gran diversidad de ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales formadas con un ácido incluyendo, pero sin limitarse a, ácidos acético, 2,2-dicloroacético, adípico, algínico, ascórbico (por ejemplo L-ascórbico), L-aspartico, bencenosulfónico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) canfórico, canfor-sulfónico, (+)-(1S)-canfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etano-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo D-glucurónico), glutámico (por ejemplo L-glutámico), α -oxoglutarico, glicólico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, isetiónico, láctico (por ejemplo (+)-L-láctico,

(±)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, (±)-DL-mandélico, metanosulfónico, naftalenosulfónico (por ejemplo naftaleno-2-sulfónico), naftaleno-1,5-disulfónico, 1-hidroxí-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, L-piroglutámico, 5 pirúvico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiociánico, toluenosulfónico (por ejemplo *p*-toluenosulfónico), undecilénico y valérico, así como aminoácidos acilados y resinas de intercambio catiónico.

[0074] Un grupo particular de sales consiste en sales formadas a partir de 10 ácidos acético, clorhídrico, yodhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, metanosulfónico (mesilato), etanosulfónico, naftalenosulfónico, valérico, acético, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico. Otro grupo de sales de adición de ácidos incluye sales formadas a partir de ácidos 15 acético, adípico, ascórbico, aspártico, cítrico, DL-Láctico, fumárico, glucónico, glucurónico, hipúrico, clorhídrico, glutámico, DL-málico, metanosulfónico, sebácico, esteárico, succínico y tartárico.

[0075] Si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo., -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una 20 sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metal alcalino, tales como Na⁺ y K⁺, cationes de metal alcalinotérreo, tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes, tales como Al³⁺. Algunos ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, el ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (p. ej., 25 NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺).

[0076] Los ejemplos de algunos iones de amonio sustituidos adecuados son los obtenidos a partir de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales 30 como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

[0077] Cuando los compuestos contienen una función de amina, estos pueden formar sales de amonio cuaternario, por ejemplo por reacción con un agente de alquilación de acuerdo con métodos conocidos para la persona experta. Tales compuestos de amonio cuaternario están dentro del alcance de los compuestos divulgados. Los compuestos que contienen una función de amina también pueden formar N-óxidos. Una referencia en el presente documento a un compuesto que contiene una función de amina también incluye el N-óxido. Cuando un compuesto contiene varias funciones amina, uno o más de un átomo de nitrógeno pueden oxidarse para formar un N-óxido. Son ejemplos de N-óxidos particulares, los N-óxidos de una amina terciaria o un átomo de nitrógeno de un heterociclo que contiene nitrógeno. Pueden formarse N-óxidos por tratamiento de la amina correspondiente con un agente de oxidación, tal como peróxido de hidrógeno o un per-ácido (por ejemplo, un ácido peroxicarboxílico), véase por ejemplo *Advanced Organic Chemistry*, de Jerry March, 4ª edición, Wiley Interscience, páginas. Más particularmente, pueden prepararse N-óxidos por el procedimiento de L. W. Deady (*Syn. Comm.* (1977), **7**, 509-514) en el que el compuesto de amina se hace reaccionar con ácido *m*-cloroperoxibenzoico (MCPBA), por ejemplo, en un disolvente inerte, tal como diclorometano.

[0078] Tal como se utiliza en la presente, el término "solvato" se refiere a una asociación física del compuesto con una o más moléculas de disolvente. La asociación física implica variar los grados de enlace iónico y covalente, incluyendo enlace de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente en la red cristalina del sólido cristalino. El término "solvato" pretende incluir solvatos tanto en fase de solución como aislables. Los ejemplos no limitantes de solvatos adecuados incluyen los compuestos divulgados en combinación con agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético o etanolamina y similares. El compuesto puede ejercer sus efectos biológicos mientras está en disolución.

[0079] Los solvatos son bien conocidos en la química farmacéutica. Estos pueden ser importantes para los procesos para la preparación de una sustancia (por ejemplo, en relación a su purificación, el almacenamiento de la sustancia (por

ejemplo, su estabilidad) y la facilidad de manipulación de la sustancia, y se forman con frecuencia como parte de las etapas de aislamiento o purificación de una síntesis química. Un experto en la materia puede determinar por medio de técnicas convencionales y largamente utilizadas si se ha formado un hidrato u otro solvato por las condiciones de aislamiento o condiciones de purificación usadas para preparar un compuesto dado. Los ejemplos de tales técnicas incluyen análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría de exploración diferencial (DSC), cristalografía de rayos X (por ejemplo, cristalografía de rayos X de un solo cristal o difracción de polvo de rayos X) y RMN de estado sólido (SS-RMN, también conocida como RMN de giro de ángulo mágico o MAS-RMN). Tales técnicas son tan parte del juego de herramientas analíticas convencionales del químico experto como la RMN, IR, HPLC y EM. Como alternativa, el experto puede formar deliberadamente un solvato usando condiciones de cristalización que incluyen una cantidad del disolvente requerida para el solvato particular. Después de esto pueden usarse los métodos convencionales descritos anteriormente para establecer si se han formado solvatos. También se engloban cualesquiera complejos (p. ej., complejos de inclusión o clatratos con compuestos tales como ciclodextrinas o complejos con metales) del inhibidor de PRMT5.

[0080] Además, el compuesto puede tener una o más formas polimorfas (cristalinas) o amorfas.

[0081] Los compuestos incluyen compuestos con una o más sustituciones isotópicas, y una referencia a un elemento particular incluye dentro de su alcance todos los isótopos del elemento. Por ejemplo, una referencia a hidrógeno incluye dentro de su alcance ^1H , ^2H (D) y ^3H (T). De forma análoga, las referencias a carbono y oxígeno incluyen dentro de sus alcances, respectivamente, ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C y ^{16}O y ^{18}O . Los isótopos pueden ser radioactivos o no radioactivos. En una realización, los compuestos no contienen isótopos radioactivos. Tales compuestos se prefieren para uso terapéutico. En otra realización, sin embargo, el compuesto puede contener uno o más radioisótopos. Los compuestos que contienen tales radioisótopos pueden ser útiles en un contexto de diagnóstico.

[0082] En algunas realizaciones, el paciente se trata con un inhibidor de PRMT5 si uno o más mutantes de U2AF1 están presentes en la muestra, en el que el inhibidor de PRMT5 es el compuesto 2 o el compuesto 80, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un solvato del mismo.

5

Métodos de tratamiento de cáncer en un paciente

[0083] Se divulgan en la presente métodos de tratamiento de cáncer en un paciente que comprenden: evaluar una muestra biológica del paciente para detectar la presencia de una o más mutaciones o amplificaciones incluyendo una
 10 mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina D1 y/o una alteración de la ruta de WNT; y tratar al paciente con un inhibidor de PRMT5 si están presentes en la muestra una o más mutaciones o amplificaciones incluyendo una mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina D1 y/o una
 15 alteración de la ruta de WNT.

[0084] Los métodos divulgados pueden usarse para tratar una variedad de tipos de cáncer incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga metastásico, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células
 20 escamosas de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, carcinoma urotelial, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer endometrial, coleagiocarcinoma, glioblastoma, gliomas, carcinoma de colon, sarcomas, tumores sólidos de origen escamoso y mieloma múltiple.

[0085] En algunas realizaciones, la etapa de evaluación comprende: aislar ARN de una muestra biológica; sintetizar ADNc a partir del ARN aislado; preamplificar el ADNc; y amplificar el ADN preamplificado con un par de cebadores que se unen a y amplifican una o más mutaciones incluyendo una mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina
 25 D1 y/o una alteración de la ruta de WNT.
 30

[0086] El aislamiento de ARN de la muestra biológica puede realizarse mediante varios procedimientos conocidos por un experto en la técnica. En una realización, puede aislarse ARN de la muestra biológica usando un kit AllPrep DNA/RNA FFPE de Qiagen (n.º de producto 80234)

- 5 **[0087]** La síntesis de ADNc a partir de ARN aislado puede realizarse mediante varios procedimientos conocidos por un experto en la técnica. En una realización, puede sintetizarse ADNc a partir de ARN aislado usando un kit de transcriptasa inversa de ADNc de alta capacidad con inhibidor de ARNasa de ABI (n.º de producto 4374966).
- 10 **[0088]** La preamplificación de ADNc puede realizarse mediante varios procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Se conocen bien en la técnica procedimientos de amplificación. En una realización, el ADNc puede preamplificarse usando una mezcla maestra TaqMan® PreAmp (Life Technologies/Applied Biosystems® n.º de producto 4391128).
- 15 **[0089]** Los inhibidores de PRMT5 adecuados para su uso en los métodos de tratamiento incluyen los previamente descritos en la presente.

Métodos de identificación de un paciente con cáncer que será sensible al tratamiento con un inhibidor de proteína arginina N-metiltransferasa 5 (PRMT5)

20 *Kits para identificar la presencia de genes mutantes o alterados*

- [0090]** Se dan a conocer además kits para identificar la presencia de una o más mutaciones o amplificaciones incluyendo una mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina D1 y/o una alteración de la ruta de WNT en una muestra biológica que comprenden: pares de cebadores que tienen las secuencias de combinación de las mismas; e instrucciones para realizar un ensayo para detectar una o más mutaciones o amplificaciones incluyendo una mutación activante de PIC3CA, una alteración del espliceosoma, una amplificación de la ruta de ciclina D1 y/o una alteración de la ruta de WNT.
- 25

[0091] El sumario, así como la siguiente descripción detallada, se entiende adicionalmente cuando se lee conjuntamente con los dibujos adjuntos. Para el fin de ilustrar los métodos, kits y cebadores divulgados, se muestran en los dibujos realizaciones a modo de ejemplo de los métodos, kits y cebadores; sin embargo, los métodos, kits y cebadores no se limitan a las realizaciones específicas divulgadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0092] Los compuestos de inhibidores de PRMT5 2 y 80 tal como se usan en los ejemplos se ejemplifican también en el documento PCT/EP2016/070097.

[0093] A continuación en la presente, el término "ta", "t.a." o "TA" significa temperatura ambiente; "Me" significa metilo; "MeOH" significa metanol; "Et" significa etilo; "EtOH" significa etanol; "NaH" significa hidruro de sodio; "DEAD" significa azodicarboxilato de dietilo; "HMPT" significa triamida de hexametilfósforo; "Boc₂O" significa anhídrido de terc-butoxicarbonilo; "ButONO" significa nitrito de terc-butilo; "TosOH" significa ácido 4-metilbencenosulfónico; "TosCl" significa cloruro de 4-metilbencenosulfonilo (también cloruro de p-toluenosulfonilo); "CMBP" significa cianometiltributylfosforano; "DBAD" significa azodicarboxilato de di-terc-butilo; "LAH" significa hidruro de aluminio y litio; "NaBH(AcO)₃" o "NaBH(OAc)₃" significa triacetoxiborohidruro de litio; "EtOAc" significa acetato de etilo; "TEA" o "Et₃N" significa trietilamina; "DCM" significa diclorometano; "c.s." significa cantidad suficiente; "Int." significa producto intermedio; "MeCN" o "ACN" significa acetonitrilo; "DMF" significa N,N-dimetilformamida; "DMA" significa N,N-dimetilacetamida; "DMF-DMA" significa N,N-dimetilformamidadimetilacetal; "Pd(dppf)Cl₂" significa [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II); "THF" significa tetrahidrofurano; "C₃₄H₂₈FeP₂.Cl₂Pd" significa [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (ii); "i-PrOH" o "iPrOH" significa 2-propanol; "CL" significa cromatografía de líquidos; "CLEM" significa cromatografía de líquidos/espectrometría de masas; "HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta resolución; "int." significa producto intermedio; "prep-HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa; "m-CPBA" significa ácido

- meta-cloroperoxibenzoico; "TFA" significa ácido trifluoroacético; "p.f." significa punto de fusión; "RP" significa fase inversa; "min" significa minuto(s); "h" significa hora(s); "PE" significa éter de petróleo; "v/v" significa volumen por volumen; "Celite®" significa tierra de diatomeas; "DMSO" significa dimetilsulfóxido; "SFC"
- 5 significa cromatografía de fluidos supercríticos; "DIPE" significa diisopropil éter; "dppf" o "DPPF" significa 1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno; "DIPEA" o "DIEA" significa N,N-diisopropiletilamina; "PPh₃" significa trifenilfosfino; "Et₂O" significa dietil éter; "Pd/C" significa paladio sobre carbono; "Pt/C" significa platino sobre carbono; "Pd(OH)₂/C" significa hidróxido de paladio sobre carbono; "CPME"
- 10 significa ciclopentil metil éter; "Pd₂(dba)₃" significa Tris(dibencilidenacetona)dipaladio; "DIAD" significa azodicarboxilato de diisopropilo; "TMSCF₃" significa trimetil(trifluorometil)silano; "TBAF" significa fluoruro de tetrabutilamonio; "psi" significa fuerza en libras por pulgada cuadrada; "Et₄NCl" significa cloruro de tetraetilamonio; "eq." significa equivalente(s);
- 15 "Pd(OAc)₂" significa acetato de paladio(II); "AcOH" significa acético; "DMAP" significa 4-(dimetilamino)piridina; "t-BuOK", "tBuOK" o "KOtBu" significa terc-butóxido de potasio; "periyodinano de Dess-Martin" significa 1,1,1-triacetoxi-1,1-dihidro-1,2-benciodoxol-3(1H)-ona; "TBDMSCl" significa cloruro de terc-butildimetilsililo; "PPh₃-polímero" o "PPh₃-pol" significa polímero de trifenilfosfina
- 20 unido; "Ph₃PCH₃Br" significa bromuro de metiltrifenilfosfonio; "Bn" significa bencilo; "Bz" significa benzoílo; "p-TSA" significa ácido 4-metilbencenosulfónico; "BF₃.Et₂O" significa complejo de trifluoruro de boro-etil éter; "9-BBN" significa 9-borabicyclo[3.3.1]nonano; "Pd-118" significa dicloro[1,1'-bis(di-terc-butilfosfino)ferroceno]paladio(II); y "CCF" significa cromatografía en capa fina;
- 25 "prep-CCF" significa CCF preparativa;

- [0094]** "p-MeC₆H₄SO₃H.H₂O" significa para ácido toluenosulfónico hidratado; "PMB" significa para-metoxibencilo; "KOAc" significa acetato de potasio; "PTSA" ácido para-toluenosulfónico; "MTBE" significa metil terc-butil éter; Rh(acac)(eth)₂ significa acetilacetatonatobis(etilen)rodio(I); "(S)-MonoPhos" significa (S)-N,N-dimetildinafto[2,1-D:1',2'-F][1,3,2]dioxafosfepin-4-amina; "Tf₂O" significa anhídrido
- 30 tríflico; "MeI" significa yoduro de metilo; "Me₂NH" significa dimetilamina; "Me₂NH.HCl" significa ácido dimetilaminaclorhídrico; "Me₄NCl" significa cloruro de

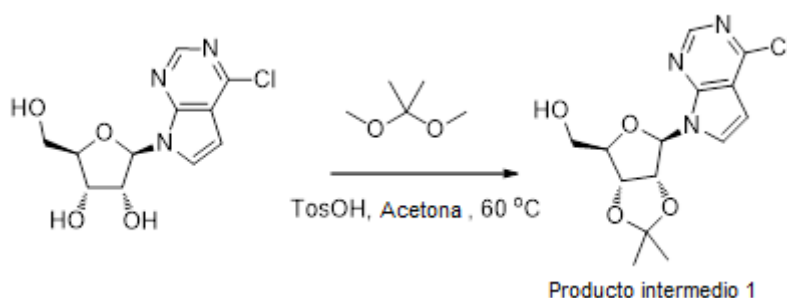
tetrametilamonio; "MeONa" significa metóxido de sodio; "Ts" significa tosilo; "MsCl" significa cloruro de mesilo; "DIBAH" significa hidruro de diisobutilaluminio;

[0095] "TBDMS" significa terc-butildimetilsililo; "Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂" significa [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II), complejo con diclorometano,;

5 "PPA" significa ácido polifosfórico; "NH₂Bn" significa bencilamina; "Pd(PPh₃)₂Cl₂" significa diclorobis(trifenilfosfino)paladio(II).

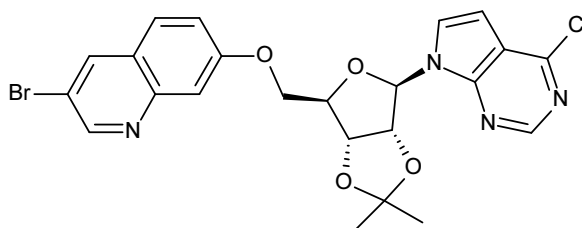
[0096] Para los intermedios que se utilizaron en un siguiente paso de reacción como un crudo o como un intermedio purificado parcialmente, se indican las cantidades molares estimadas (en algunos casos indicadas con $\approx$) en los
10 protocolos de reacción descritos posteriormente o, como alternativa, se indican las cantidades molares teóricas.

Preparación del compuesto intermedio 1



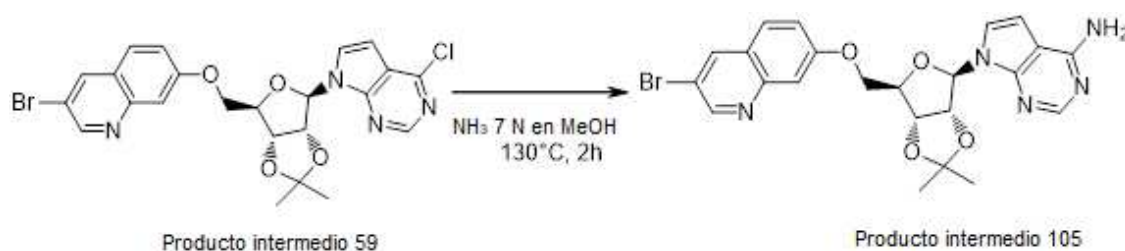
15 **[0097]** A una mezcla de 6-cloro-7-deazapurinabeta-d-ribósido (25.0 g, 87.5 mmol) en acetona (330 mL) se le añadieron 2,2-dimetoxipropano (18.2 g, 175 mmol) y ácido 4-metilbencenosulfónico (TosOH) (1.51 g, 8.75 mmol) en una porción a 25°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 60 °C durante 2 horas. La mezcla se enfrió hasta 25°C. La reacción se extinguió añadiendo NaHCO₃ saturado (100
20 mL) lentamente y luego se extrajo con acetato de etilo (125 mL x 5). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera saturada (120 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente: DCM/acetato de etilo de 1:0 a 2:1) para proporcionar el producto intermedio 1 en bruto (38.0 g) como una goma
25 amarilla clara.

Preparación del compuesto intermedio 59



[0098] Se añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (0.221 mL, 1.125 mmol) a una suspensión agitada del producto intermedio 1 (0.27 g, 0.80 mmol), 3-bromoquinolin-7-ol (0.18 g, 0.80 mmol) y resina con trifenilfosfina (0.375 g, 3 mmol/g, 1.125 mmol) en THF (8 mL) a temperatura ambiente. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre un lecho de Dicalite®. El residuo se lavó con metanol. Los disolventes del filtrado se evaporaron. El residuo se utilizó tal cual en el siguiente paso.

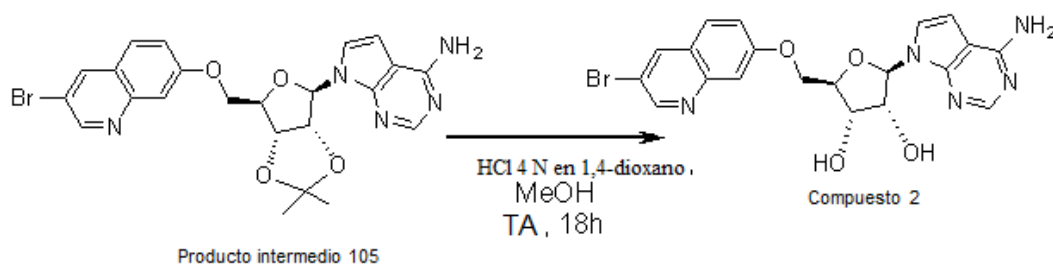
Preparación del compuesto intermedio 105



[0099] El producto intermedio 59 (c.s., teóricamente 0.83 mmol) se disolvió en NH₃ 7 M en MeOH (20 mL, 7 M, 140 mmol). La disolución resultante se agitó y se calentó a 130°C utilizando irradiación de microondas durante 2 horas. Los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó sobre una columna de SiO₂, tipo Grace Reveleris SRC, 12 g, Si 40, en un sistema de purificación Grace Reveleris X2 utilizando diclorometano y metanol como eluyentes en un gradiente del 100% de DCM durante 20 volúmenes de columna al 20% de MeOH y el 80% de DCM durante 20 volúmenes de columna. Las

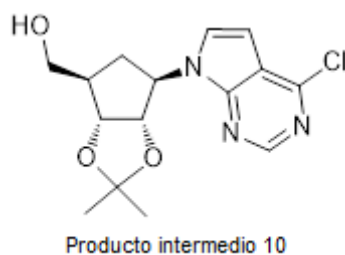
fracciones que contenían el producto se combinaron y los disolventes se evaporaron para proporcionar el producto intermedio 105 en bruto (175 mg) que se utilizó tal cual en la siguiente etapa de reacción.

5 Preparación del compuesto 2

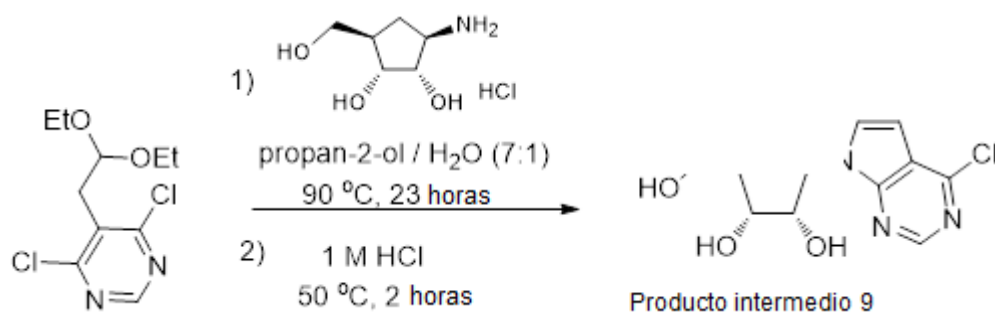


[00100] Se añadió HCl 4 M en dioxano (0.7 mL, 2.9 mmol) a una disolución agitada de producto intermedio 105 (175.1 mg, en bruto, $\approx$ 0.29 mmol) en MeOH (10 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La reacción se extinguió mediante la adición de 1.5 mL de una disolución 7 N de NH₃ en MeOH. Los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en DCM. El precipitado se separó por filtración. El filtrado se purificó sobre una columna de SiO₂, tipo Grace Reveleris SRC, 12 g, Si 40, en un sistema de purificación Spot II Ultimate de Armen utilizando DCM y MeOH como eluyentes en un gradiente, comenzando con un 100% de DCM y acabando con un 40% de MeOH y un 60% de DCM. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y los disolventes se evaporaron para proporcionar 24.5 mg del compuesto 2.

20 Preparación del compuesto intermedio 10

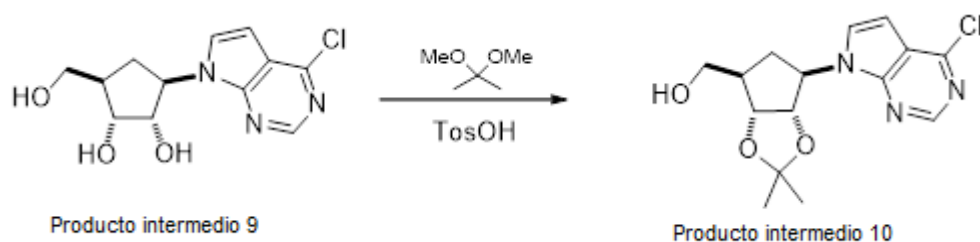


Paso a)



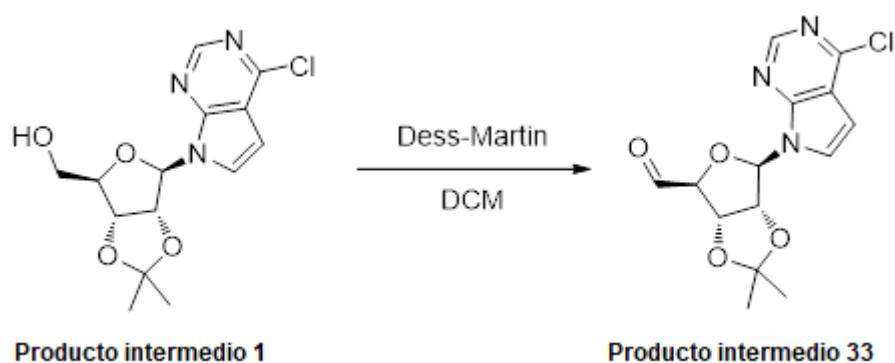
[00101] A una mezcla de 4,6-dicloro-5-(2,2-dietoxietil)pirimidina (14.0 g, 52.8 mmol) y clorhidrato de (1R,2S,3R,5R)-3-amino-5-(hidroximetil)ciclopentano-1,2-diol (10.7 g, 58.1 mmol) en propan-2-ol/H₂O (208 mL, 7:1), se le añadió Et₃N (13.4 g, 132 mmol) en una porción a 25°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 90 °C durante 23 horas. La mezcla se enfrió hasta 50°C y se añadió HCl 4 M (24 mL, 106 mmol) lentamente. El residuo se agitó entonces a 50°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta 25°C y se añadió lentamente NaHCO₃ (14 g, 100 mmol). Se añadió acetato de etilo (230 mL), seguido por la adición de una disolución de NaHCO₃ semisaturada (c.s.). Se aisló la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (230 mL x 2). Se secó la fase orgánica combinada con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío para proporcionar el producto intermedio 9 como un sólido amarillo (17.4 g, rendimiento cuantitativo en 2 etapas). El producto crudo se utilizó directamente tal cual en el siguiente paso de reacción sin una purificación adicional.

Etapa b)



[00102] A una mezcla de producto intermedio 9 (17.4 g, ≈ 52.7 mmol) en acetona (250 mL) se le añadió 2,2-dimetoxipropano (11.0 g, 105 mmol) y TsOH.H₂O (908 mg, 5.27 mmol) en una porción a 25°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 60°C durante 2 horas. La mezcla se enfrió hasta 25°C y la disolución se concentró a vacío, se extinguió mediante NaHCO₃ saturado (100 mL) lentamente y luego se extrajo con acetato de etilo (100 mL x 3). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera saturada (100 mL), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice (elución en gradiente: DCM/acetato de etilo de 1/0 a 2/1) para proporcionar el producto intermedio 10 como una goma amarilla clara (15.5 g, 89 % de rendimiento).

Preparación del compuesto intermedio 33

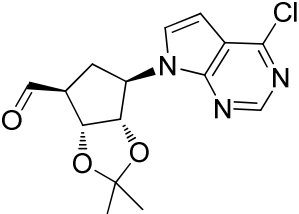


15

[00103] A una mezcla de producto intermedio 1 (2.00 g, teóricamente 6.18 mmol) en DCM (40 mL) se le añadió peryodinano de Dess-Martin (5.24 g, 12.36 mmol) en una porción a 0°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 0 °C durante 3 horas. A la mezcla se le añadió Na₂S₂O₃ (4 g) en NaHCO₃ saturado (20 mL) y se agitó durante 10 min. Se extrajo la fase acuosa con DCM (20 mL x 3). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera saturada (20 mL x 2), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío para proporcionar el producto intermedio 33 (1.80 g, en bruto) como una goma amarilla clara. El producto crudo se utilizó directamente en el siguiente paso de reacción sin una purificación adicional.

[00104] Los siguientes productos intermedios se prepararon mediante un protocolo de reacción análogo al utilizado para la preparación del producto intermedio 33 utilizando los materiales de partida apropiados (Tabla 7).

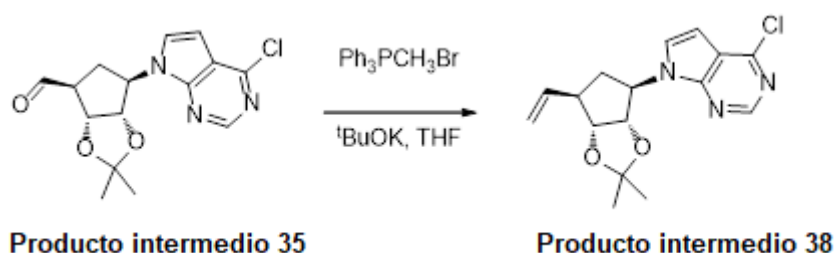
Tabla 7:

Int.	Estructura	Material de partida
35		<i>producto intermedio 10</i>

5

Preparación del compuesto intermedio 38

Método 1

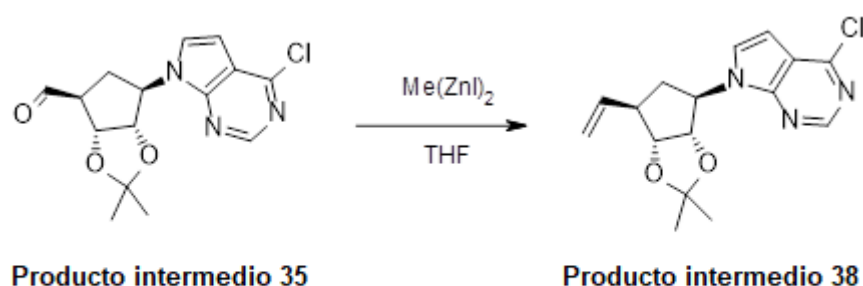


- 10 **[00105]** A una mezcla de bromuro de metiltrifenilfosfonio (4.87 g, 13.62 mmol) en THF (500 mL) se le añadió *t*-BuOK (11.4 mL, 1 M en THF, 1.27 g, 11.35 mmol) gota a gota a 0 °C bajo N₂. La suspensión se tornó amarillo brillante, se agitó a 0 °C durante 0.5 h y a continuación se calentó hasta 25 °C durante 0.5 h. La mezcla se enfrió hasta -40 °C. La solución del intermedio 35 (1.46 g, teóricamente 4.54
- 15 mmol) en THF (130.0 mL) se añadió gota a gota y a continuación se agitó a -20 °C durante 1 h, después de esto la mezcla se calentó hasta 25 °C durante 2 h. A la mezcla se le añadió NH₄Cl saturado (300 mL) y se agitó durante 10 min. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con DCM (300 mL x 2). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera saturada (500 mL), se secó con MgSO₄

anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (ISCO®; columna flash de sílice de 80 g SepaFlash®, elución en gradiente: de un 0 a un 15% de acetato de etilo/éter de petróleo). Las fracciones deseadas se recogieron y se evaporó el disolvente. Se obtuvo el producto intermedio 38 como un sólido blanquecino (530 mg, rendimiento del 36%).

Método 2:

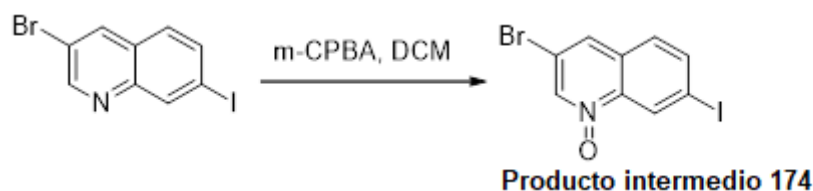
producto intermedio 38



10

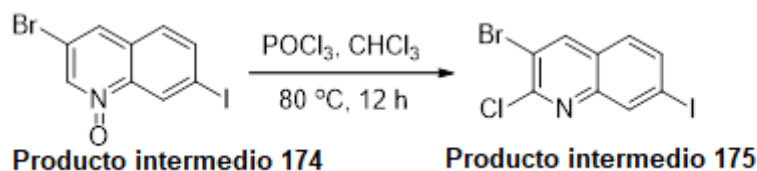
[00106] Una disolución del producto intermedio 35 (10.0 g, teóricamente 31.1 mmol) en THF (100 mL) se añadió gota a gota en N₂ durante un periodo de 30 minutos a una disolución de bis(yodozincio)metano en THF (180 mL, 0.31 M, 55.9 mmol, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en Tetrahedron 2002, 58, 8255-8262) y se continuó agitando hasta una conversión total (aproximadamente 2 horas). La mezcla de reacción se extinguió mediante la adición lenta de una disolución acuosa saturada de NH₄Cl, durante la cual se observó formación de sal. Antes de la extracción (EtOAc, 2 x 200 mL), las sales se disolvieron de nuevo mediante la adición de una solución de amoníaco acuoso (25%). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa de bisulfito de sodio y salmuera, se secaron con MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (eluyente: diclorometano/EtOAc 95/5) para proporcionar el producto intermedio 38 como un sólido blanquecino (6.9 g, 66%).

Preparación del compuesto intermedio 174



[00107] Se disolvió 3-bromo-7-yodoquinolina (5.99 g, 17.7 mmol) en diclorometano (60 mL) y a continuación se añadió *m*-CPBA (4.57 g, 26.5 mmol) en porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. La mezcla se extinguió mediante una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (40 mL) y una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (PH a 6-7), luego se extrajo mediante diclorometano (50 mL x3). Las fases orgánicas se lavaron con H₂O (50 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó mediante una columna de gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1 a 1/1) para proporcionar el producto intermedio 174 deseado (1.9 g, 14.1% de rendimiento) como un sólido amarillo.

15 Preparación del *intermedio 175*

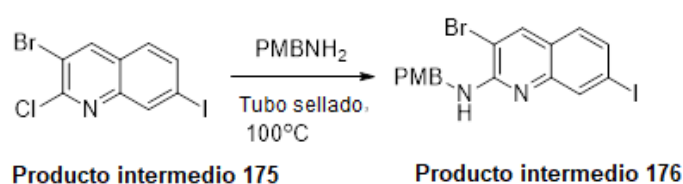


[00108] A una solución del producto intermedio 174 (2.9 g , 8.29 mmol) en cloroformo (60 mL) se le añadió tricloruro de fosforilo (8.3 g, 54.1 mmol). La

mezcla se agitó a 80 °C durante 12 h. La mezcla se evaporó a presión reducida para obtener el producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: éter de petróleo/acetato de etilo = de 10/1 a 1/1). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron para obtener el
 5 producto intermedio 175 (1.3 g, 41.5% de rendimiento) como un sólido blanco.

Preparación del **intermedio 176**

10

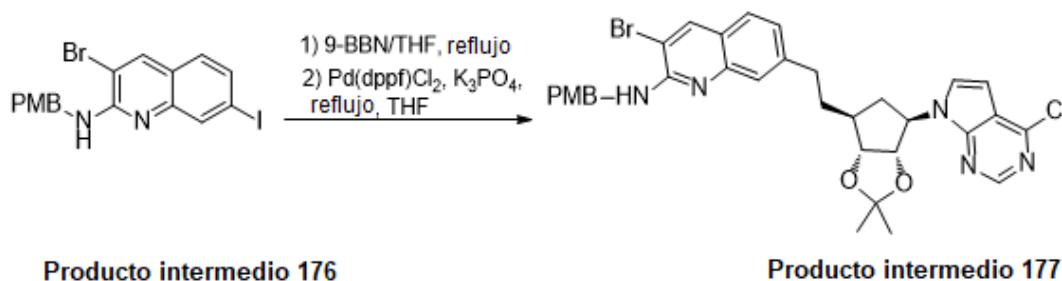


15

[00109] Se añadió 4-metoxibencilamina (1.34 g, 9.78 mmol) a la mezcla del producto intermedio 175 (0.8 g, $\approx$ 1.95 mmol) en etanol (10 mL). La mezcla se calentó en un tubo sellado a 100 °C durante 12 h. La mezcla se evaporó al vacío para obtener el producto crudo. Este se purificó mediante cromatografía en
 columna (eluyente en gradiente: acetato de etilo/éter de petróleo de 0/1 a 1/10). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron para obtener el producto intermedio 176 (600 mg, 51.6% de rendimiento) como un aceite.

20

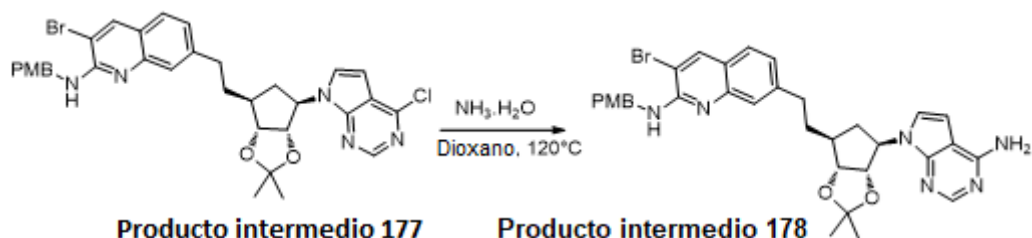
Preparación del compuesto intermedio 177



[00110] Una mezcla del producto intermedio 38 (44 mg, 0.138 mmol) en 9-BBN (1.3 ml, 0.69 mmol, 0.5 M in THF) se sometió a reflujo durante 1 h bajo N₂. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, luego se añadió K₃PO₄ (87 mg, 0.413 mmol) en H₂O (1mL), seguido por THF (5 ml), producto intermedio 176 (122.727 mg, ≈0.206 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) (4.48 mg, 0.007 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se concentró. El residuo se disolvió en acetato de etilo (40 mL) y se lavó con agua (6 mL) y salmuera (6 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para obtener la fracción 1 del producto intermedio 177 en bruto (120 mg, 71.5% de rendimiento).

[00111] Una mezcla del producto intermedio 38 (233.7 mg, 0.73 mmol) en 9-BBN (7.31 ml, 3.65 mmol, 0.5 M in THF) se sometió a reflujo durante 1 h bajo N₂. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente, luego se añadió K₃PO₄ (87 mg, 0.413 mmol) en H₂O(1mL), seguido por THF (5 ml), producto intermedio 176 (478 mg, ≈0.80 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II)(23.8 mg, 0.037 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se concentró. El residuo se disolvió en acetato de etilo (40 mL) y se lavó con agua (6 mL) y salmuera (6 mL). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para obtener la fracción 2 de producto intermedio 177 en bruto 2 (600 mg, 63.1% de rendimiento). Las dos fracciones se combinaron y se purificaron mediante cromatografía en columna (eluyente en gradiente: acetato de etilo/éter de petróleo de 1/10 a 1/1). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron para obtener el producto intermedio 177 (300 mg, 61.0% de rendimiento) como un sólido.

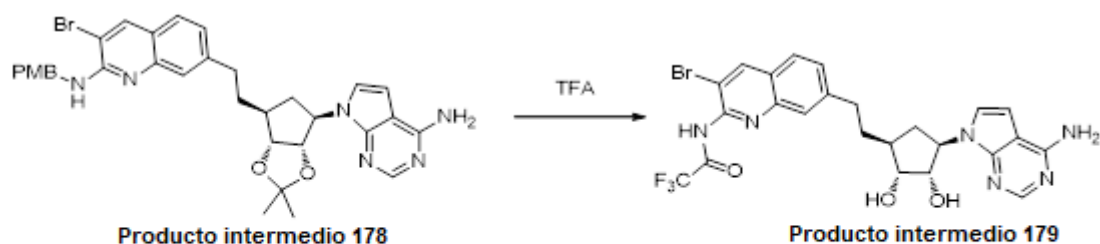
Preparación del compuesto intermedio 178



[00112] Se agitó una mezcla de producto intermedio 177 (300 mg, ≈ 0.446 mmol) y $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 ml) en dioxano (10 ml) en un tubo sellado a 120°C durante 14 h. Esta reacción se evaporó al vacío para obtener el producto intermedio 178 (250 mg, 87.1% de rendimiento) como un aceite.

Preparación del compuesto intermedio 179

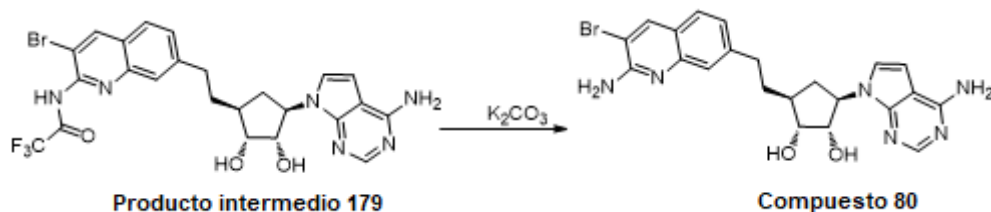
10



[00113] La mezcla del producto intermedio 178 (250 mg, ≈ 0.388 mmol) en TFA (5 mL) se agitó a 50°C durante 1 h. La mezcla se evaporó al vacío para obtener el producto intermedio 179 (350 mg, 63.4% de rendimiento) como un aceite.

15

Preparación del compuesto 80



- 5 **[00114]** La mezcla de producto intermedio 179 (350 mg) y K₂CO₃(102 mg, 0.74 mmol) en metanol (3 mL) se agitó a 60°C durante 1 h. La mezcla se filtró y se evaporó al vacío para obtener un producto crudo. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna: Xbridge Prep OBD C18 150x30 mm, 5 µm de Waters, condición: gradiente de agua (0.05% de hidróxido de amonio v/v)-
- 10 ACN). Se recogieron las fracciones deseadas y el disolvente se evaporó para obtener el compuesto 80 (113.3 mg, 94.9% de rendimiento) como un sólido blanco.

Parte Analítica

15 **RMN**

- [00115]** Para varios compuestos, se registraron los espectros de ¹H RMN en un Bruker DPX-360 que operaba a 360 MHz, en un Bruker Avance 600 que operaba a 600 MHz, en un Bruker Avance 400 que operaba a 400 MHz o en un espectrómetro Varian 400MR que operaba a 400 MHz. Como disolventes, se
- 20 usaron CLOROFORMO-d (cloroformo deuterado, CDCl₃), metanol-d₄ o DMSO-d₆ (DMSO deuterado, dimetil-d₆ sulfóxido). Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) respecto al tetrametilsilano (TMS), que se utilizó como patrón interno.

- Co. 80: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.50 - 1.56 (m, 1 H) 1.68 - 1.75 (m, 1 H) 1.85 - 1.92 (m, 1 H) 1.96 (ddt, J=13.0, 9.0, 6.5, 6.5 Hz, 1 H) 2.25 (dt, J=12.7,
- 25

7.9 Hz, 1 H) 2.69 - 2.80 (m, 2 H) 3.76 (t a, $J=4.7$ Hz, 1 H) 4.21 (dd, $J=7.6$, 6.0 Hz, 1 H) 4.57 (s a, 1 H) 4.72 (s a, 1 H) 4.80 (dt, $J=10.5$, 7.9 Hz, 1 H) 6.50 (s a, 2 H) 6.59 (d, $J=3.5$ Hz, 1 H) 7.07 (s a, 2 H) 7.12 (dd, $J=8.2$, 1.6 Hz, 1 H) 7.29 (d, $J=3.6$ Hz, 1 H) 7.34 (s, 1 H) 7.58 (d, $J=8.1$ Hz, 1 H) 8.07 (s, 1 H) 8.31 (s, 1 H).

5

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES del ensayo *in vitro* (ensayo 1a y 1b)

Reactivos.

[00116] La enzima PRMT5-MEP50 se adquirió de Charles River (Argentina). El complejo enzimático fue producido en células de insecto (Sf9) que se habían infectado simultáneamente con dos baculovirus. Un virus expresa la PRMT5 humana completa con una etiqueta Flag en el extremo N, el segundo virus expresa una MEP50 completa con una escisión His6-TEV en el extremo N. La proteína se purificó por afinidad utilizando microesferas anti-Flag (M2) eluidas con el péptido 3xFLAG, después con His-Select eluido con imidazol 0.5 M. Después, la proteína eluida se sometió a diálisis contra una solución salina tamponada con tris (TBS) (pH 8.0) que contenía un 20 % de glicerol y ditioneitol 3 mM (DTT).

[00117] La histona H2A recombinante humana no marcada completa (residuos 1-130, n.º de acceso Genbank NM_021052, PM = 14.1 kDa) expresada en *E. coli* se adquirió de Reaction Biology Corporation, n.º de cat. HMT-11-146. Los reactivos utilizados para generar el tampón de reacción o para detener la reacción se compraron, incluida la base Tris (Sigma, n.º de cat. T-1503), NaCl (Sigma, n.º de cat. RGF-3270), MgCl₂ (Sigma, n.º de cat. M0250), DTT (Invitrogen, n.º de cat. 15508-013) y ácido fórmico (Riedel deHaen, n.º de cat. 33015)

25 Ensayo de espectrómetro de masas de alto rendimiento

[00118] PRMT5 cataliza las metilaciones secuenciales de los átomos de nitrógeno terminales de los grupos de guanidina de los residuos de arginina en las proteínas utilizando el cosustrato S-adenosil-L-metionina (AdoMet, SAM), para formar monometilarginina (MMA), dimetilarginina simétrica (sDMA) y S-adenosil-L-

homocisteína (AdoHcy, SAH). La actividad enzimática se determinó controlando la formación del producto SAH utilizando la espectrometría de masas ultrarrápida (Sistema Rapidfire 300 de Agilent acoplado a un QTrap® triple-cuad MS/MS serie 4000 de Sciex). El tampón de reacción fue Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, NaCl 50 mM, 5 MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM. La actividad de la reacción se detuvo utilizando un 1 % de ácido fórmico (concentración final).

[00119] Estudios de inhibición Los estudios de CI50 se realizaron utilizando series de dosificación de once puntos realizadas para cada compuesto con diluciones en serie 1:2 en sulfóxido de dimetilo (DMSO), siendo el punto 12 un control de DMSO. En primer lugar se dispusieron los compuestos en puntos en las placas, y le siguió la adición de mezcla de disolución de SAM 2 µM y H2A 0.6 µM (histona H2A). Se añadió el mismo volumen de solución enzimática para iniciar las reacciones enzimáticas. Las concentraciones finales de la reacción son SAM 1 µM, H2A 0.3 µM y enzima 10 nM (ensayo 1a) o enzima 1.25 nM (ensayo 15 1b). La reacción se incubó a 30 °C durante 60 minutos (min) cuando se utilizó enzima 10 nM y durante 120 min cuando se utilizó enzima 1.25 nM. Posteriormente, la reacción se desactivó mediante la adición de ácido fórmico hasta una concentración final de un 1%. Las inhibiciones de la formación de SAH en presencia de los compuestos se calcularon como un porcentaje del control 20 respecto a la reacción no inhibida en función de la concentración de inhibidor. Los datos se ajustaron de la siguiente manera:

[00120]
$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\log \text{CI50} - X) * h)})$$

[00121] donde CI50 es la concentración de inhibidor (la misma unidad que X) al 50 % de inhibición y h es la pendiente de Hill. Y es el porcentaje de la inhibición, X es el log de la concentración del compuesto. La parte Inferior y Superior son las mesetas en las mismas unidades que Y.

[00122] Los valores de pCI50 en la tabla 1 a continuación son valores promediados (Co. No. significa compuesto número).

Co. No.	pCl ₅₀ ensayo 1a	pCl ₅₀ ensayo 1b
2	8.1	7.6
80	9.9	9.7

Tabla 1

Ejemplo 1: Las mutaciones activantes de PIK3CA están asociadas con sensibilidad a inhibidor de PRMT5 en SCLC.

5

[00123] Se evaluó el perfil de sensibilidad celular del compuesto 2 en la subclasificación de SCLC de un panel amplio de líneas celulares de cáncer de pulmón. Sorprendentemente, algunas de las líneas celulares más sensibles albergan diferentes mutaciones de ganancia de función en el gen de PIK3Cα, y se

10 mencionan en la tabla 2. La activación de la ruta de PI3Kα (mutaciones de ganancia de función o estimulación de la ruta) como respuesta tumoral hacia la terapia convencional (cisplatino) o incluso hacia agentes dirigidos como la última generación de inhibidores de PARP, implica un papel crucial en el proceso de

15 resistencia que podría estar vinculado con una baja supervivencia global del paciente con SCLC tras la terapia.

Línea celular	Mutación de PIK3CA	Subtipo histológico	GI50
NCI-H1048	H1047R	SCLC	94.62nM
LU99a	T1025A	SCLC	128.53nM
H69V	G106_R108del	SCLC	85.62nM

Tabla 2

Ejemplo 2: Las alteraciones del espliceosoma están asociadas con sensibilidad a inhibidores de PRMT5 en NSCLC

5 **[00124]** Se sabe que eventos de corte y empalme específicos de cáncer inician la malignidad y también contribuyen a la progresión de la enfermedad. Hasta la fecha, se ha descrito que dos proteínas implicadas en el corte y empalme, U2AF1 y RBM10, han perdido la regulación en NSCLC.

10 **[00125]** U2AF1, un factor de corte y empalme bien caracterizado, alberga una mutación de punto caliente de ganancia de función (S34F) en el 3-8% de los pacientes con NSCLC. Recientemente, la proteína de unión a ARN RBM10, también crucial para el ensamblaje del espliceosoma, se ha clasificado como supresor de tumores que se inactiva mediante mutaciones de pérdida d función, predominantemente en pacientes con NSCLC (~8%) con una historia de
15 tabaquismo.

[00126] Las proteínas Sm, cruciales para el ensamblaje del espliceosoma, se han descrito como sustratos directos de PRMT5 y, por tanto, la función de PRMT5 se ha vinculado con la modulación de la actividad del espliceosoma.

20 **[00127]** Puesto que la mutación de ganancia de función de S34F en U2AF1 se ha confirmado como oncogénica, se ensambló un pequeño panel de todas las

líneas celulares de NSCLC disponibles comercialmente, que albergan la mutación S34F, para analizar la posible relación letal sintética entre U2AF1-S34F y la inhibición de PRMT5.

[00128] Todas (tres de tres) las células de NSCLC que albergan este mutación de punto caliente son sensibles en cuanto a la proliferación al compuesto 2 de inhibidor de PRMT5, véase la tabla 3.

Línea celular	Gen / mutación	Subtipo histológico	GI50
NCI-H441	U2AF1-S34F	Adenocarcinoma	98.40nM
LC-2/ad	U2AF1-S34F	Adenocarcinoma	116.08nM
HCC78	U2AF1-S34F	Adenocarcinoma	107.65nM

Tabla 3

Ejemplo 3: Las amplificaciones de la ruta de ciclina D1 están asociadas con sensibilidad a inhibidores de PRMT5 en NSCLC

[00129] Se ha notificado amplificación y/o expresión aumentada de la familia de ciclinas G1 en múltiples cánceres, incluyendo NSCLC. Se ha observado una correlación entre PRMT5 y la expresión de moduladores del ciclo celular, incluyendo ciclina D1, CDK4 y CDK6, lo que sugiere que PRMT5 puede tener un efecto regulador sobre la fase G1. El análisis del panel de líneas celulares de pulmón tratadas con el compuesto 2 reveló una asociación significativa entre la(s) amplificación/amplificaciones de ciclina D1/CDK4/CDK6 y la sensibilidad a la inhibición de PRMT5, indicando que pueden usarse aberraciones de la ruta de ciclinas como marcadores para la selección de pacientes. La tabla 4 muestra que líneas celulares de NSCLC que albergan tal(es) amplificación/amplificaciones de ciclina D1/CDK4/CDK6 son sensibles al tratamiento con el compuesto 2.

Línea celular	Gen amplificado	Subtipo histológico	GI50
EPLC272H	Ciclina D1	Adenocarcinoma	98.53nM
NCI-H226	CDK4	Adenocarcinoma	204.52nM
HLC1	CDK6	Carcinoma de células escamosas	96.39nM

Tabla 4

Ejemplo 4: Las alteraciones de la ruta de WNT están asociadas con sensibilidad a inhibidores de PRMT5

- 5 **[00130]** Líneas celulares que albergan mutaciones en genes clave de señalización de Wnt, incluyendo β -catenina y APC, muestran sensibilidad al tratamiento de inhibición de PRMT5 tal como se muestra en la tabla 5

Línea celular	Gen / mutación	Subtipo histológico	GI50
A427	CTNNB1/T41A	Adenocarcinoma	166.52nM
HCC15	CTNNB1/S45F, Y670*	Carcinoma de células escamosas	266.07nM
LK2	APC/W685*, E1020K	Carcinoma de células escamosas	114.53nM

Tabla 5

EJEMPLOS

[00131] Los expertos en la técnica apreciarán que pueden hacerse numerosos cambios y modificaciones en las realizaciones preferidas de la invención y que tales cambios y modificaciones pueden hacerse sin apartarse del espíritu de la invención. Por tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas de tales variaciones que se encuentran dentro del espíritu y alcance verdaderos de la invención.

[00132] Las divulgaciones de cada patente, solicitud de patente y publicación mencionada o descrita en este documento se incorporan por la presente como referencia, en su totalidad.