

COMPUESTOS ÚTILES PARA INHIBIR A CDK7

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos
5 útiles para inhibir cinasa 7 dependiente de ciclina (CDK7,
por sus siglas en inglés), composiciones farmacéuticas, y
métodos para tratar enfermedades relacionadas con la
actividad de CDK7.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las cinasas dependientes de ciclina (CDKs) son una
clase principal de cinasas y son importantes en la
proliferación de células de cáncer y transcripción oncogénica
desregulada. La CDK7 se une a ciclina H y MAT1 para formar
una cinasa de activación de ciclina trimérica (CAK) que
15 realiza su función fosforilando otras CDKs involucradas en el
control del ciclo celular. Estos complejos controlan las
transiciones específicas entre dos fases subsecuentes en el
ciclo celular. La CDK7 está implicada en tanto el control
temporal del ciclo celular y actividad transcripcional. La
20 CDK7 está implicada en el proceso de iniciación
transcripcional por fosforilación de la subunidad Rbp1 de
polimerasa II de ARN (RNAPII). La proliferación celular no
controlada y transcripción desregulada es una característica
del cáncer. Dirigir la CDK7 selectivamente puede ofrecer una
25 ventaja inhibiendo simultáneamente la transcripción activa y

el progreso del ciclo celular. Por lo tanto, la CDK7 es un objetivo prometedor para el tratamiento de cáncer, en particular cánceres difíciles de tratar y agresivos.

Los inhibidores de molécula pequeña contra CDK7 han sido reportados en la literatura (véase, por ejemplo, documentos WO 2015/154022, WO 2016/142855, WO 2016/160617, WO 2016/193939, y WO 2017/044858). Permanece una necesidad para proporcionar inhibidores de CDK7 los cuales pueden ser usados en el tratamiento de trastornos proliferativos celulares, tales como cáncer. Adicionalmente, existe una necesidad de proporcionar inhibidores de CDK7, las cuales son selectivas para CDK7 comparado con otras CDK2.

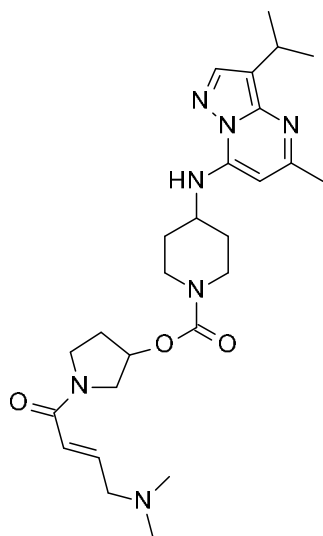
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos novedosos que son inhibidores de CDK7 selectivos. Tales compuestos novedosos podrían atender la necesidad de tratamiento efectivo, potente de cáncer, especialmente cáncer con transcripción desregulada. La presente invención podría también atender la necesidad de tratamiento efectivo, potente de cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, y/o gliomas.

La presente invención proporciona un compuesto de

fórmula:

5



10

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

Especialmente preferida es una sal de besilato. También preferida es la sal de hidrato de hemi-edisilato.

La presente invención también proporciona un método
 15 para el tratamiento de cáncer, en particular para el
 tratamiento de cáncer con transcripción desregulada.
 Preferiblemente, el cáncer es cáncer urotelial, cáncer
 uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de
 pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer
 20 hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer
 de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de
 piel, o gliomas. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer
 colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de
 ovario, o cáncer gástrico. Muy preferiblemente, el cáncer es
 25 cáncer de mama.

La presente invención también proporciona un método para tratar cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas en un paciente, que comprende pruebas para determinar la presencia de al menos una pérdida de la mutación de función en los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y/o *RB1* en una muestra biológica a partir del paciente y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de la presente invención, en particular [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable al paciente si las muestras de prueba dan positivo para al menos una pérdida de la mutación de función en cualquiera de los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y/o *RB1*. Preferiblemente, la sal es una sal de besilato o una sal de hidrato de hemi-edisilato. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, o cáncer gástrico. Muy preferiblemente, el cáncer es cáncer de mama.

Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de tumor y la muestra es sometida a ensayo por secuenciamiento de ADN/genómico. Preferiblemente, la muestra se obtiene a partir del paciente previo a una primera administración al compuesto o sal del mismo, preferiblemente [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, al paciente. Preferiblemente, la sal es una sal de besilato o una sal de hidrato de hemi-edisilato. Preferiblemente, the gene es el gen *ARID1A*. Preferiblemente, el gen es el gen *KMT2C*. Preferiblemente, el gen es el gen *KMT2D*. Preferiblemente, el gen es el gen *RB1*.

La presente invención también proporciona un método para tratar cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas en un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de la presente invención, en particular [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable

al paciente siempre que una muestra biológica del paciente contenga al menos una pérdida de la mutación de función en los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y/o *RB1*. Preferiblemente, la sal es una sal de besilato o una sal de hidrato de hemi-
5 edisilato. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, o cáncer gástrico. Muy preferiblemente, el cáncer es cáncer de mama. Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de tumor y la muestra es sometida a ensayo por
10 secuenciamiento de ADN/genómico. Preferiblemente, la muestra se obtiene a partir del paciente previo a una primera administración al compuesto o sal del mismo, preferiblemente [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-
[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-
15 il)amino]piperidin-1-carboxilato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, al paciente. Preferiblemente, la sal es una sal de besilato o una sal de hidrato de hemi-
edisilato. Preferiblemente, el gen es el gen *ARID1A*. Preferiblemente, el gen es el gen *KMT2C*. Preferiblemente, el
20 gen es el gen *KMT2D*. Preferiblemente, el gen es el gen *RB1*.

La presente invención también proporciona un método para tratar cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer
25 pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata,

cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas en un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o sal de la presente invención, en particular [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente siempre que el paciente se seleccione para tratamiento si una muestra biológica a partir del paciente

10 prueba ser positiva para al menos una pérdida de la mutación de función en los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y/o *RB1*. Preferiblemente, la sal es una sal de besilato o una sal de hidrato de hemi-edisilato. Más preferiblemente, el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste de cáncer

15 colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, o cáncer gástrico. Muy preferiblemente, el cáncer es cáncer de mama. Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de tumor y la muestra es sometida a ensayo por secuenciamiento de ADN/genómico. Preferiblemente, la muestra

20 se obtiene a partir del paciente previo a una primera administración al compuesto o sal del mismo, preferiblemente [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato o una sal del mismo

25 farmacéuticamente aceptable, al paciente. Preferiblemente, la

sal es una sal de besilato o una sal de hidrato de hemi-edisilato. Preferiblemente, el gen es el gen *ARID1A*. Preferiblemente, el gen es el gen *KMT2C*. Preferiblemente, el gen es el gen *KMT2D*. Preferiblemente, el gen es el gen *RB1*.

5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en combinación con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una modalidad
10 adicional, la composición comprende además, uno o más de otros agentes terapéuticos. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de la invención, o una sal del mismo farmacéuticamente
15 aceptable, en combinación con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. En aún una modalidad adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer con transcripción desregulada que comprende un
20 compuesto de la invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, en combinación con uno o más portadores, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. En ales modalidades, el cáncer es cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de
25 mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico,

cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas.

En una modalidad preferida, el cáncer es cáncer
5 colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, o cáncer gástrico. En una modalidad más preferida, el cáncer es cáncer de mama.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención o una sal del mismo
10 farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de cáncer que comprende también realizar un ensayo *in vitro* usando una muestra biológica a partir del paciente, determinando la presencia de al menos una mutación de inactivación en los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y *RB1*, y
15 administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto o sal del mismo al paciente si al menos una mutación de inactivación en cualquiera de los genes está presente. En tal modalidad, el cáncer es para uso en el tratamiento de cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer
20 colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas. Preferiblemente, la muestra biológica es una
25 muestra de tumor y la muestra es sometida a ensayo por

secuenciamiento de ADN/genómico. Preferiblemente, el compuesto o sal del mismo se administra al paciente a una dosis de aproximadamente 1 mg hasta 2 g. Preferiblemente, la muestra se obtiene a partir del paciente previo a la primera
5 administración del compuesto o la sal del mismo al paciente. Preferiblemente, un paciente se selecciona por tener una mutación de inactivación en el gen *ARID1A*. Preferiblemente, el paciente se selecciona por tener una mutación de inactivación en el gen *KMT2C*. Preferiblemente, un paciente se
10 selecciona por tener una mutación de inactivación en el gen *KMT2D*. Preferiblemente, un paciente se selecciona por tener una mutación de inactivación en el gen *RB1*.

Además, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal del mismo
15 farmacéuticamente aceptable, para uso en terapia, en particular para el tratamiento de cáncer con transcripción desregulada. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para la
20 manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer con transcripción desregulada. En tales modalidades, el cáncer es cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer
25 pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata,

cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas. En una modalidad preferida, el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, o cáncer gástrico. En una modalidad más
5 preferida, el cáncer es cáncer de mama.

En aún una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en terapia, en particular para el tratamiento de cáncer. En una modalidad
10 adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En ales modalidades, el cáncer es cáncer urotelial, cáncer uterino,
15 cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas. En una modalidad preferida, el cáncer es cáncer
20 colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, o cáncer gástrico. En una modalidad más preferida, el cáncer es cáncer de mama. Además, la presente invención proporciona para la manufactura de un medicamento para para el tratamiento de un cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer
25 colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de

ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas, que comprende también realizar un ensayo in vitro

5 usando una muestra biológica a partir del paciente, determinando la presencia de al menos una mutación de inactivación en los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y *RB1*, y administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto o sal del mismo al paciente si al menos una

10 mutación de inactivación en cualquiera de los genes está presente. Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de tumor y la muestra es sometida a ensayo por secuenciamiento de ADN/genómico. Preferiblemente, el compuesto o sal del mismo se administra al paciente a una

15 dosis de aproximadamente 1 mg hasta 2 g. Preferiblemente, la muestra se obtiene a partir del paciente previo a la primera administración del compuesto o sal del mismo al paciente. Preferiblemente, un paciente se selecciona por tener al menos una mutación de inactivación en el gen *ARID1A*.

20 Preferiblemente, un paciente se selecciona por tener al menos una mutación de inactivación en el gen *KMT2C*. Preferiblemente, un paciente se selecciona por tener al menos una mutación de inactivación en el gen *KMT2D*. Preferiblemente, un paciente se selecciona por tener al menos

25 una mutación de inactivación en el gen *RB1*.

La presente invención proporciona un compuesto de la invención [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato en una forma de sal cristalina. La presente invención también proporciona hidrato de hemi-edisilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato cristalino. La presente invención también proporciona hidrato de hemi-edisilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción en polvo de rayos-X que tiene picos característicos usando radiación CuK α , en $2\theta \pm 0.2^\circ$, que ocurre a 18.5° en combinación con uno o más picos seleccionados a partir del grupo que consiste de 21.5° , 16.7° , y 15.2° . La presente invención también proporciona besilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato cristalino. La presente invención también proporciona besilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato en una forma cristalina

caracterizada por un patrón de difracción en polvo de rayos-X que tiene picos característicos usando radiación CuK α , en $2\theta \pm 0.2^\circ$, que ocurre a 21.5° en combinación con uno o más picos seleccionados a partir del grupo que consiste de 12.4° ,
 5 17.3° , y 15.8° . La presente invención también proporciona clorhidrato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato cristalino. La presente invención también proporciona clorhidrato de [(3S)-
 10 1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato en una forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción en polvo de rayos-X que tiene picos característicos usando radiación CuK α , en 2θ
 15 $\pm 0.2^\circ$, que ocurre a 18.9° en combinación con uno o más picos seleccionados a partir del grupo que consiste de 5.5° , 15.5° , y 9.7° .

La presente invención también abarca intermediarios y procesos útiles para la síntesis de un compuesto de la
 20 presente invención.

El término "tratar" (o "trata" o "tratamiento" como se usa en la presente se refiere a restringir, reducir, detener o invertir el progreso o severidad de un síntoma, condición o trastorno existente.

25 Como se usa en la presente, los términos "cáncer" y

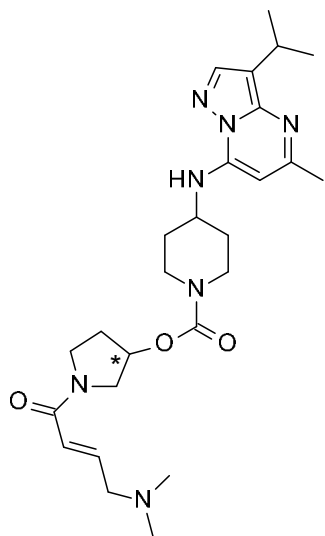
"canceroso" se refiere a, o describe la condición fisiológica en pacientes que son típicamente caracterizados típicamente por proliferación celular no regulada. Incluida en esta definición están cánceres benignos y malignos. Por "cáncer de
5 etapa temprana" o "tumor de etapa temprana" significa un cáncer que no es avanzado o metastásico o es clasificado como cáncer Etapa 0, I, o II. Ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer urotelial, cáncer uterino, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de
10 ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatobiliar, cáncer pancreático, cánceres cervicales, cáncer de próstata, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de piel, o gliomas.

Un compuesto de la presente invención puede
15 reaccionar para formar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y metodología común para prepararlas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, P. Stahl, et al. *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH,
20 2011); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, Enero 1977).

El experto en la técnica apreciará que un compuesto de la invención, como se muestra en (I), o sal del mismo farmacéuticamente aceptable, está comprendido de un núcleo
25 que contiene un centro quiral, como se representa por *

abajo:

5



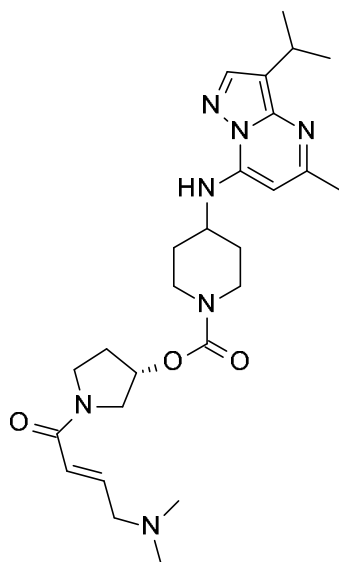
10

(I)

15

Aunque la presente invención contempla todos los enantiómeros individuales, así como también mezclas de los enantiómeros de tales compuestos que incluyen racematos, el compuesto preferido de la invención es representado por (II) siguiente:

20



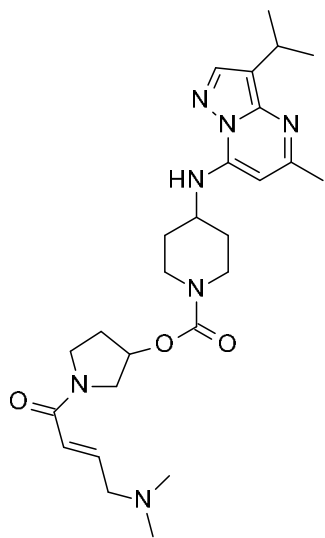
25

(II)

o sales del mismo farmacéuticamente aceptables.

El experto en la técnica también apreciará que las designaciones Cahn-Ingold-Prelog (R) o (S) para todos los centros quirales variarán dependiendo de los patrones de sustitución del compuesto particular. Los enantiómeros únicos
5 pueden ser preparados comenzando con reactivos quirales o por técnicas sintéticas estereoespecíficas o estereoselectivas. Alternativamente, los enantiómeros únicos pueden ser aislados a partir de mezclas por técnicas de cristalización o cromatográficas quirales estándares en cualquier punto
10 conveniente en la síntesis de los compuestos de la invención. Los enantiómeros únicos de compuestos de la invención son una modalidad preferida de la invención.

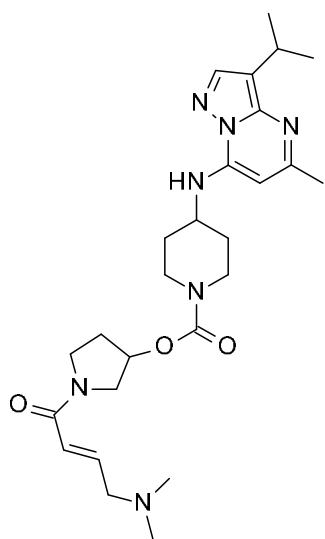
Un compuesto de la presente invención es preferiblemente formulado como composiciones farmacéuticas
15 administradas por una variedad de rutas. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las mismas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005)). Más particularmente
20 preferida, está una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula,



(I)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable y uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

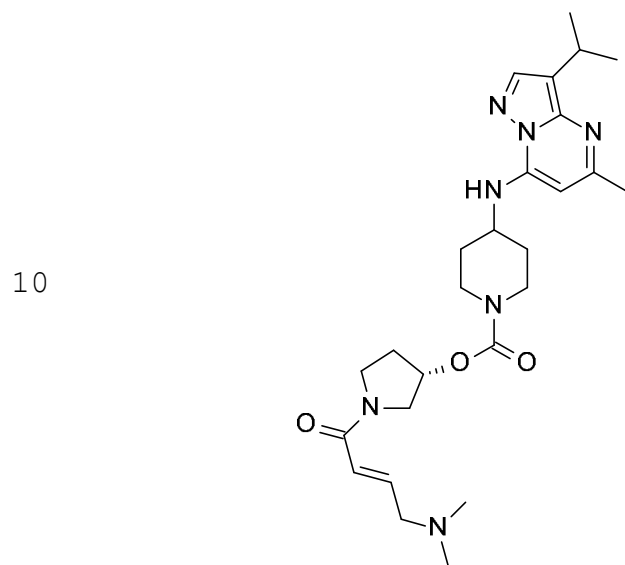
Una modalidad preferida de la presente invención es



(I)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

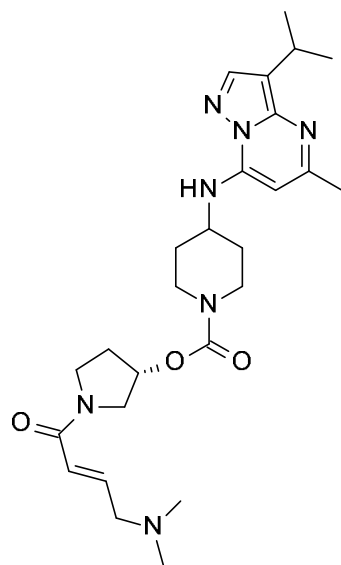
Una modalidad especialmente preferida de la presente invención se refiere al compuesto, (3S)-1-[(2E)-4-(Dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il 4-{[5-metil-3-(propan-2-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il]amino}piperidin-1-carboxilato:



(II)

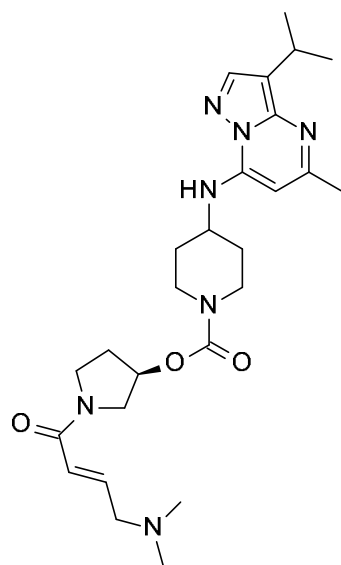
o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Especialmente preferida en la sal de besilato o sal de hidrato de hemi-edisilato.

Otra modalidad especialmente preferida de la presente invención se refiere al compuesto, (3S)-1-[(2E)-4-(Dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il 4-{[5-metil-3-(propan-2-il)pirazolo[1,5-A]pirimidin-7-il]amino}piperidin-1-carboxilato:



(II)

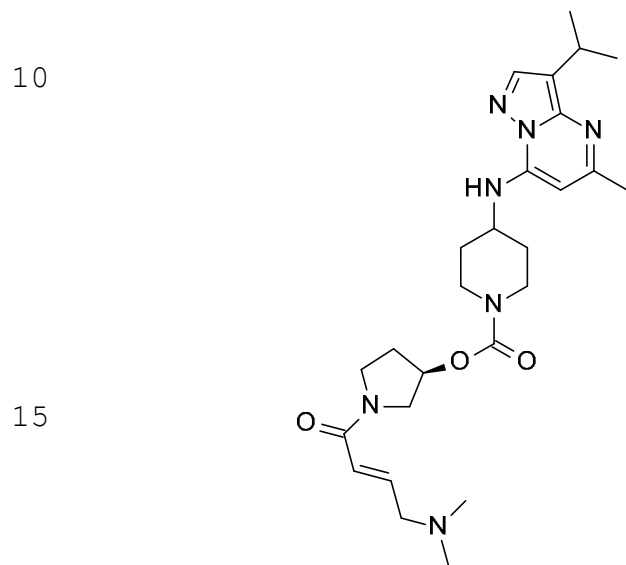
Una modalidad especialmente preferida adicional de la presente invención se refiere al compuesto, (3R)-1-[(2E)-4-(Dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il 4-{[5-metil-3-(propan-2-il)pirazolo[1,5-A]pirimidin-7-il]amino}piperidin-1-carboxilato (como se muestra por (III) abajo):



, (III)

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Especialmente preferido en la sal de besilato o sal de hidrato de hemi-edisilato.

Otra modalidad especialmente preferida de la presente invención se refiere al compuesto, (3R)-1-[(2E)-4-(Dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il 4-{[5-metil-3-(propan-2-il)pirazolo[1,5-A]pirimidin-7-il]amino}piperidin-1-carboxilato:



(III)

Los compuestos de la presente invención son en general efectivos sobre un intervalo de dosificación amplio. Por ejemplo, las dosificaciones por día caen dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 2 g. En algunos casos los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado pueden ser más que adecuados, mientras en otros casos, dosis todavía más grandes

pueden ser empleadas, mientras mantienen un perfil de beneficio/riesgo favorable, y por lo tanto el intervalo de dosificación anterior no está propuesto para limitar el alcance de la invención en cualquier forma. Se entenderá que la cantidad
5 del compuesto actualmente administrado será determinada por un especialista, en vista de las circunstancias relevantes, que incluyen la condición que será tratada, la ruta elegida de administración, el compuesto actual o compuestos administrados, la edad, peso, y respuesta del paciente
10 individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

Los isómeros y enantiómeros individuales pueden ser separados o resueltos por uno de habilidad ordinaria en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis de compuestos de la invención, por métodos tales como técnicas
15 de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véase, por ejemplo, J. Jacques, et al., "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley y Sons, Inc., 1981, y E.L. Eliel and S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994).

20 Adicionalmente, ciertos intermediarios descritos en la presente pueden contener uno o más grupos protectores. El grupo protector variable puede ser el mismo o diferente en cada caso dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares que serán
25 realizadas. Las condiciones de protección y desprotección son

bien conocidas para el experto en la técnica y se describen en la literatura (Véase por ejemplo, *"Greene's Protective Groups in Organic Synthesis"*, Fourth Edition, por Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

5 Ciertas abreviaturas se definen como sigue: ^1H NMR" se refiere a ^1H -resonancia magnética nuclear; "eq" se refiere a equivalente; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "DCM" se refiere a diclorometano; "MeCN" o "ACN" se refiere a acetonitrilo; "DMSO" se refiere a dimetil sulfóxido; "MTBE" se refiere a metil terc-butil éter; "TEA" se refiere a trimetilamina; "HATU" se refiere a 3-óxido-hexafluorofosfato de I-[Bis(dimetilamino)metilen]-I 8-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; "MeOH" se refiere a metanol; "TLC" se refiere a cromatografía de capa delgada; "UV" se refiere a ultravioleta; "Columna LC" se refiere a columna de cromatografía líquida; "DMEA" se refiere a dimetilmetilamina; "EtOAc" se refiere acetato de etilo; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "SCX" se refiere a intercambio catiónico fuerte; "ca." se refiere a alrededor o aproximadamente; "RBF" se refiere a matraz de fondo redondo; "ATP" se refiere a trifosfato de adenosina; "DTT" se refiere a ditiotreitól; "HEPES" se refiere a (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico); "EDTA" se refiere a ácido Etilendiaminatetraacético; "ATCC" se refiere a Colección de Cultivo Tipo Americano; "RT" se refiere a temperatura

ambiente; "PBS" se refiere a salina amortiguada con fosfato; "BSA" se refiere a albúmina de suero bovino; "FBS se refiere a suero bovino fetal; "ARNase" se refiere a ribonucleasa; "cADN" se refiere a ADN complementario; "GST" se refiere a glutational S-transferasa; "His" se refiere a histidina; "GSH" se refiere a glutational; y "HBSS" se refiere a Solución de Sal Balanceada de Hank.

Los compuestos de la invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, pueden ser preparados por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, así como también a las Preparaciones y Ejemplos siguientes. Las etapas específicas para cada una de las rutas descritas pueden ser combinadas en diferentes formas, o en conjunto con etapas a partir de diferentes esquemas de reacción, para preparar compuestos de la invención, o sales del mismo farmacéuticamente aceptables. Los productos de cada etapa en los esquemas de reacción siguientes pueden ser recuperados por métodos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración, y cristalización. Los reactivos y materiales de partida son fácilmente disponibles para uno de habilidad ordinaria en la técnica.

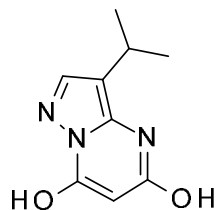
Las siguientes preparaciones y ejemplos ilustran además la invención y representan la síntesis típica de los compuestos de la presente invención.

Preparaciones y Ejemplos

Preparación 1

Síntesis de 3-isopropilpirazol[1,5-a]pirimidin-5,7-diol.

5

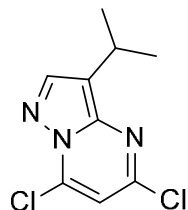


Se agregó etóxido de sodio (979 g, 14.4 moles, 3.0 eq) y malonato de dietilo (998 g, 6.23 moles, 3.0 eq) a 23 °C a una solución de 4-isopropil-1H-pirazol-3-amina (600 g, 4.79 moles) en etanol (4.2 L) y la mezcla se calentó a 80 °C (temperatura interna) por 15 horas. Se enfrió la mezcla a 25 °C, se agregó 1 M HCl acuoso (2.0 L) (pH final = 2.0), se filtró, se lavó lo sólido con agua (2.0 L), y se secó para obtener 3-isopropilpirazol[1,5-a]pirimidin-5,7-diol (600 g, 65%) como un sólido blanco. ES/MS m/z 194 (M+H).

Preparación 2

Síntesis de 5,7-dicloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidina.

20



25

Se agregó POCl₃ (2.00 L, 25.8 moles, 10 eq) y N,N-

dimetilanilina (162 mL, 2.58 moles, 1.0 eq) a una suspensión de 3-isopropilpirazol[1,5-a]pirimidin-5,7-diol (500 g, 2.58 moles) en MeCN (1.25 L) a 50 °C y la mezcla se calentó a 100 °C por 36 horas. Se enfrió a 23 °C, se vertió por goteo en 5 1:1 hielo / amortiguador de fosfato (1 M, pH = 8, 10 L) y se agitó por 15 horas. Se filtró, se lavó lo sólido con agua (5.0 L) y se secó para obtener 5,7-dicloro-3-isopropilpirazol[1,5-a]pirimidina (375 g, 63%) como un sólido marrón. ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 230/232 (M+H). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1.32 10 (d, 6H), 3.19 (dq, 1H), 7.58 (s, 1H), 8.31 (s, 1H).

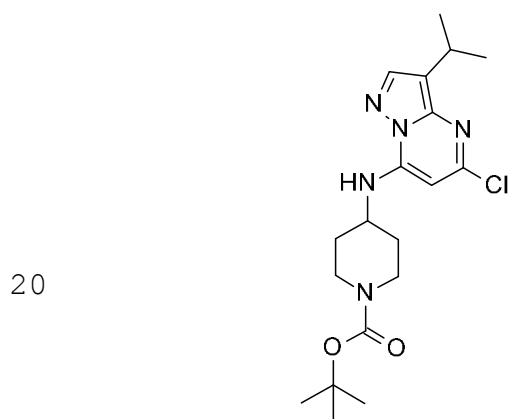
Síntesis alternativa de 5,7-dicloro-3-isopropilpirazol[1,5-a]pirimidina.

Se agregó etóxido de sodio -21% en etanol- (17.9 mL, 47.9 mmol) a una solución de 4-isopropil-1H-pirazol-5- 15 amina (5 g, 39.9 mmol) y malonato de dietilo (6.74 mL, 43.9 mmol) en etanol (150 mL) y se agitó a TA. Después de 5 minutos, se calentó a 90 °C y se agitó. Después de 18 horas, se enfrió a TA y se concentró bajo presión reducida. Se disolvió el residuo con agua y se agregó 1 N ácido 20 clorhídrico a pH=3. Se filtró lo precipitado blanco y se secó bajo presión reducida a 50 °C por 18 horas. Se suspendió lo sólido resultante, 3-isopropilpirazol[1,5-a]pirimidin-5,7-diol (4.92 g, 25.5 mmol, 0.638) en oxícloruro fosforoso (48 mL) y se agregó N,N-dimetilanilina (2.3 mL). Se sometió a 25 reflujo la mezcla a 110 °C. Después de 2 horas, se enfrió a

TA y se concentró bajo presión reducida. Se vertió el residuo se vertió en una solución hielo/agua y se extrajo con DCM (dos veces). Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio. Se
 5 filtró, y se concentró bajo presión reducida para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea (gel de sílice), eluyendo con acetato de etilo: acetato para proporcionar 5,7-dicloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidina (4.45 g, 19.3 mmol) como un sólido marrón. MS (m/z):
 10 230,232(M+1). ¹H NMR (400.21 MHz, DMSO): 8.31 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 3.19 (m, 1 H), 1.32 (d, J= 7.0 Hz, 6H).

Preparación 3

Síntesis de 4-[(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-
 15 butilo.

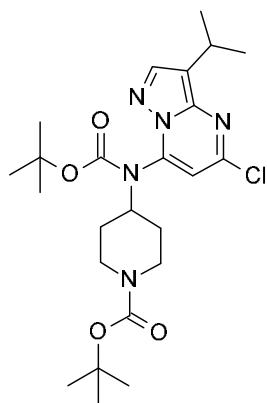


Se agregó N,N-diisopropiletilamina (189 mL, 140 g, 1080 mmol, 2 eq) y 4-aminopiperidin-1-carboxilato de terc-
 25 butilo (114 g, 570 mmol, 1.05 eq) a una suspensión de

5,7-dicloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidina (130 g, 542 mmol) en 2-propanol (1.0 L) a 23 °C y se agitó la mezcla por 18 horas. Se filtró, se lavó lo sólido con MTBE (200 mL), y se secó para obtener 4-[(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (182 g, 85% de rendimiento) como sólido amarillo. ES/MS m/z ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) 394/396 (M+H). ^1H NMR (d_6 -DMSO) δ 1.28 (d, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.61 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 3.10 (dq, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.98 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 8.07 (d, 1H).

Preparación 4

Síntesis de 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo.



Se agregó N,N- diisopropiletilamina (69.1 mL, 51.2 g, 396 mmol, 1 eq), 4-dimetilaminopiridina (4.84 g, 39.6 mmol, 0.1 eq), y dicarbonato de di-terc-butilo (200 mL, 190 g, 871 mmol, 2.2 eq) a una solución de 4-[(5-cloro-3-

isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (156 g, 396 mmol) en THF (936 mL) at 23 °C, y se calentó la mezcla a 50 °C (temperatura interna) por 21 horas. Se enfrió a 23 °C y se concentró in vacuo para obtener 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (195 g, 99%) como un sólido anaranjado. ES/MS m/z (³⁵Cl/³⁷Cl) 438/440 (M+H-56). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1.20 (s, 9H), 1.31 (d, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.46 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 2.75 (m, 1H), 3.19 (dq, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.18 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 8.19 (s, 1H).

Síntesis alternativa de 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo.

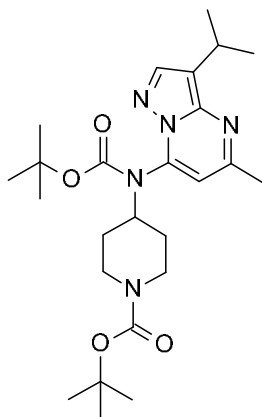
Se agregó 4-aminopiperidin-1-carboxilato de terc-butilo (2.8 g, 14 mmol) a una solución de 5,7-dicloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidina (3.1 g, 13 mmol) en etanol (32 mL). Se calentó a 80 °C. Después de 18 horas, se enfrió a TA y se concentró bajo presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea (gel de sílice), eluyendo con acetato de etilo:DCM para proporcionar 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo como un sólido blanco. Espectro de masa (m/e): 394,396(M+1). Se agregó carbonato de terc-butoxicarbonil terc-butilo (1.14 g,

5.22 mmol) a una solución de 4-[(5-cloro-3-isopropil-
 pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de
 terc-butilo (940 mg, 2.386 mmol) y 4-dimetilaminopiridina
 (290 mg, 2.33 mmol) en THF (7 mL). Se calentó la mezcla a 60
 5 °C. Después de 30 minutos, se enfrió a TA y se concentró bajo
 presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía
 instantánea (gel de sílice), eluyendo con DCM para
 proporcionar 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-
 pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de
 10 terc-butilo (1.1 g) como un aceite amarillento. Espectro de
 masa (m/z): 438 (M-t-Bu). ¹H NMR (400.13 MHz, d₆-DMSO): 8.19
 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.95 (m, 2
 H), 3.19 (m, 1 H), 1.87 (m, 2 H), 1.47 (m, 2 H), 1.35 (s, 9
 H), 1-31 (d, 6H), 1.19 (s, 9H).

15 **Preparación 5**

Síntesis de 4-[terc-butoxicarbonil-(3-isopropil-5-
 metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-
 carboxilato de terc-butilo.

20



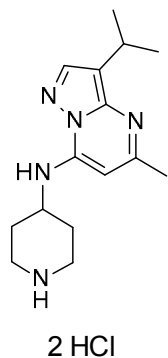
25

Se agregó aducto DCM de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio (II) (15.7 g, 19.3 mmol, 0.05 eq), fosfato de potasio tribásico (245 g, 1160 mmol, 3 eq), y 2,4,6-trimetil-1,3,5,2,4,6-trioxatriborinano
 5 (50 % de masa en THF, 75.3 mL, 67.6 g, 270 mmol, 0.7 eq) a una solución de 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (190 g, 385 mmol) en 1,4-dioxano (1.5 L) a 90 °C (temperatura interna). Después de 5 días, se enfrió a 23 °C,
 10 se filtró a través de una almohadilla de tierra diatomácea, y se enjuagó lo sólido con THF (3 x 250 mL). Se trataron los filtrados combinados a 23 °C con resina Tiol SiliaMetS® (40-63 µm; carga = 1.46 mmol/g; 320 g, 467 mmol), y se calentó a 65 °C por 18 horas. Se enfrió a 23 °C, se filtró, y se lavó
 15 la resina con DCM (2 x 250 mL). se concentraron los filtrados combinados in vacuo, se disolvió el residuo en MTBE (1 mL), se lavó con agua (200 mL), se secó (MgSO₄), y se concentró in vacuo para obtener 4-[terc-butoxicarbonil-(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-
 20 carboxilato de terc-butilo (182 g, 100%) como un sólido marrón. ES/MS m/z 474 (M+H).

Preparación 6

Síntesis de diclorhidrato de 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina.

5



Se agregó ácido clorhídrico en 2-propanol (5.50 mol/L, 349 mL, 1920 mmol, 5 eq) a una suspensión de 4-[terc-butoxicarbonil-(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)aminol]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (182 g, 384 mmol) en 2-propanol (1.4 L) a 23 °C, y la mezcla se calentó a 70 °C (temperatura interna) por 3 horas. Se enfrió a 23 °C, se filtró, se lavó lo sólido con MTBE (2 x 200 mL) y se secó para obtener diclorhidrato de 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (95 g, 71% de rendimiento) como sólido amarillo. Se combinaron los licores madre, se diluyó con MTBE (2 L), se filtró, se lavó lo sólido con MTBE (2 x 50 mL), y se secó para obtener material adicional (8.42 g, 15% de rendimiento). ES/MS m/z 274 (M+H).

¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1.28 (d, 6H), 2.04 (m, 4H), 2.61 (s, 3H), 3.00 (m, 2H), 3.40 (m, 3H), 4.16 (m, 2H), 6.68 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.80 (m, 1H), 9.21 (m, 1H), 9.86 (m, 1H).

Síntesis alternativa de diclorhidrato de 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina.

Se disolvió 7-cloro-3-isopropil-5-metilpirazol[1,5-a]pirimidina (2.1 kg, 10.0 mol) y diisopropiletilamina (4.18 L, 2.4 eq) en isopropanol (16.8 L, 8 mL/g). Se cargó 4-aminopiperidin-1-carboxilato de terc-butilo (2.6 kg, 1.3 eq.) a la mezcla de reacción y se calentó a 75-80 °C por 16 horas. Se enfrió la mezcla de reacción a 5-10 °C y se agregó una solución 4 M de ácido clorhídrico en isopropanol (17.5 L, 7.0 eq). Se calentó a 40-45 °C por 4 horas. Se enfrió a 25-30 °C y se filtró la mezcla para proporcionar el compuesto del título (2.25 kg, 72.7% de rendimiento). Se usó el material en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.16 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.29-4.26 (m, 1 H), 3.63 (d, *J* = 15.0 Hz, 2H), 3.26 - 3.12 (m, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.40 (d, *J* = 15.0 Hz, 2H), 2.08 (dd, *J* = 10.0, 25.0 Hz, 2H), 1.31 (d, *J* = 5.0 Hz, 6H).

Síntesis alternativa de 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina como base libre.

Se agregó 1,4-dioxano (15 mL) a una mezcla de 4-[terc-butoxicarbonil-(5-cloro-3-isopropil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (689 mg, 1.39 mmol), 2,4,6-trimetil-1,3,5,2,4,6-trioxatriborinano (350 mg, 2.79 mmol) y fosfato de potasio tribásico (1.2 g, 5.5 mmol,). Se hizo burbujear N₂ en la solución por 5 minutos. Se agregó aducto DCM de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II) (60 mg,

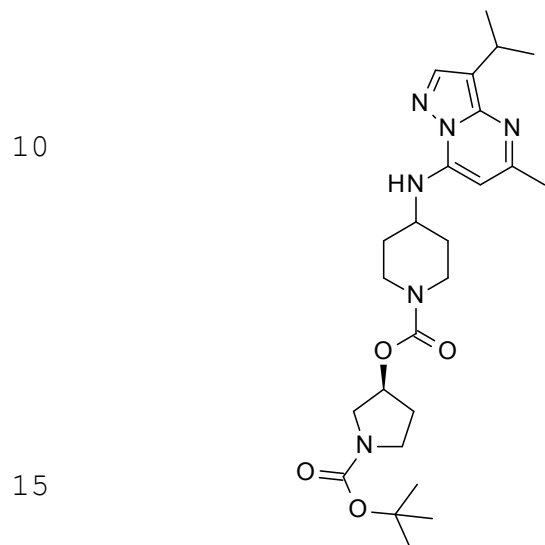
0.072 mmol). Se calentó a 110 °C. Después de 1.5 horas se agregó más [1,1-bis(difenilfosfino)ferrocen]dicloropaladio(II) (60 mg, 0.072 mmol) y se calentó a 100 °C. Después de 18 horas, se enfrió a TA, se filtró la mezcla a través de una almohadilla de filtro cel, se enjuagó con acetato de etilo y se concentró bajo presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea (gel de sílice), eluyendo con acetato de etilo y DCM para proporcionar 4-[terc-butoxicarbonil-(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (537 mg, 1.077 mmol) como un aceite anaranjado. Espectro de masa (m/z): 474(M+1).

Se agregó ácido trifluoroacético (2.5 mL, 33 mmol) por goteo a una solución de 4-[terc-butoxicarbonil-(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (537 mg, 1.077 mmol) en DCM (12 mL). Se agitó a TA. Después de 2 horas, se concentró la mezcla bajo presión reducida. Se purificó el residuo por elución del cartucho SCX-2 con 10% DCM: MeOH después MeOH (2 N NH₃). Se concentró la fracción básica bajo presión reducida para proporcionar 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (345 mg, 1.199 mmol) como un sólido marrón. Espectro de masa (m/z): 274(M+1). ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO): 7.82 (s, 1 H), 7.23 (d,

1H), 6.08 (s, 1 H), 3.58 (m, 1 H), 3.12 (m, 1 H), 2.97 (m, 2 H), 2.58 (m, 2 H), 2.39 (s, 3 H), 2.10 (m, 2 H), 1.28 (d, 6 H).

Preparación 7

5 Síntesis de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-terc-butoxicarbonilpirrolidin-3-il]



Se agregó fósgeno (20 % de masa en tolueno, 348 mL, 485 g, 981 mmol, 2.4 eq) a una solución de (3S)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo (76.5 g, 409 mmol) en THF (765 mL) se colocó en un RBF de 3 cuellos conectado a un frasco depurador que contiene 32% de NH₄OH acuoso, a 23 °C por 1 hora. Se hizo burbujear N₂ a través de la mezcla por 30 minutos, y se concentró in vacuo. Se disolvió el residuo en DCM (757 mL), se enfrió a 0 °C (temperatura interna), y se agregó (adición lenta durante 7

20

25

minutos) una suspensión de diclorhidrato de 3-isopropil-5-
 metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (94.6 g,
 273.2 mmol) en DCM (756.8 mL), previamente tratado con
 trietilamina (228 mL, 166 g., 1639 mmol, 6 eq). Se removió el
 5 baño enfriante después de la adición, y se apagó la reacción
 después de 30 minutos con 35% de HCl acuoso (20 mL) y 1 M de
 HCl acuoso (300 mL) (pH final = 7). Se separó la capa
 orgánica, se lavó con agua (300 mL) y NaCl acuoso saturado
 (300 mL), se secó (MgSO₄), y se concentró in vacuo. Se
 10 disolvió el residuo (ca. 180 g) en DCM (1.5 L), se agregó
 resina Tiol SiliaMetS® (40-63 µm; carga = 1.46 mmol/g; 10 g,
 14.6 mmol, 140 eq con base en contenido de Pd) a 23 °C, y
 después se calentó la mezcla a 40 °C por 2 horas. Se filtró,
 se enjuagó la resina con DCM (2 x 10 mL), y se concentraron
 15 los filtrados combinados in vacuo para obtener 4-[(3-
 isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-
 il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-terc-
 butoxicarbonilpirrolidin-3-il] (129 g, 97%) como sólido
 amarillo. ES/MS m/z 487 (M+H). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1.28 (d,
 20 6H), 1.40 (s, 9H), 1.65 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.96 (m, 1H),
 2.07 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.90 (m, 2H), 3.31 (m, 5H), 3.89
 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 5.10 (m, 1H), 6.32 (s, 1H), 8.01 (s,
 1H).

Síntesis alternativa de 4-[(3-isopropil-5-metil-
 25 pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de

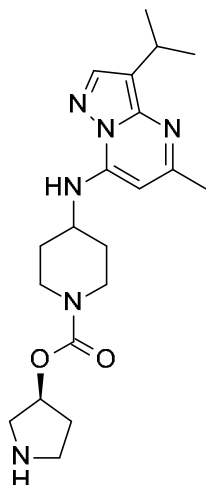
[(3S)-1-terc-butoxicarbonilpirrolidin-3-il]

Se disolvió (3S)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo (438 g, 1.3 eq.) en ACN (4.4 L, 10.0 mL/g) a 15-30 °C. Se agregó trietilamina (595 mL, 4.5 eq.) seguido
 5 por cloroformiato de 4-nitrofenilo (490 g, 1.4 eq.) a 15-30 °C. Se calentó a 35-40 °C y se agitó la mezcla por 4 horas. Se enfrió a 15-25 °C y se agregó 3-isopropil-5-metil-N-(piperidin-4-il)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (500 g, 1.8 mol). Se agitó a 15-30 °C por 5 horas. Se concentró bajo
 10 presión reducida. Se agregó 2-metiltetrahidrofurano (4.4 L, 10.0 mL/g), se agitó, y se filtró. Se lavó lo filtrado secuencialmente con 2 M de NaOH (1.1 L, 2.5 mL/g, 4 veces) y NaCl acuoso saturado (4.4 L, 10.0 mL/g). Se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. Se agregó
 15 alcohol isopropílico (2.2 L, 5 mL/g) para obtener una solución del compuesto del título (660 g, 75.4% de rendimiento).

Preparación 8

Síntesis de [(3S)-pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-
 20 5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato.

5



Se agregó ácido clorhídrico en 2-propanol (5.50
 10 mol/L, 217 mL, 1190 mmol, 5 eq) a una suspensión de [4-[(3-
 isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-
 il)amino]piperidin-1-carboxilato de (3S)-1-terc-
 butoxycarbonilpirrolidin-3-il] (116 g, 239 mmol) en
 2-propanol (755 mL) at 23 °C, y la mezcla se calentó a 70 °C
 15 por 90 minutos. Se enfrió a 23 °C, y se concentró in vacuo.
 Se suspendió el residuo en DCM (1.5 L), se agregó 1 M de NaOH
 acuoso (400 mL) y 50% de NaOH acuoso (100 mL). Se agitó por
 15 minutos. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO₄), y se
 concentró in vacuo. Se suspendió el residuo (ca. 131 g) en
 20 MTBE / hexano (2:1, 900 mL), y se agitó la mezcla por 18
 horas. Se filtró, se lavó lo sólido filtrado con hexano (2 x
 100 mL), y se secó para obtener [(3S)-pirrolidin-3-il] 4-[(3-
 isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-
 il)amino]piperidin-1-carboxilato (82.7 g, 90% de rendimiento)
 25 como sólido amarillo. ES/MS m/z 387 (M+H). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ

1.28 (d, 6H), 1.60 (m, 3H), 1.88 (m, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.91 (m, 4H), 3.13 (dq, 1H), 3.78 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 5.10 (m, 1H), 6.14 (s, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.87 (s, 1H).

Síntesis alternativa de [(3S)-pirrolidin-3-il] 4-
 5 [(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato.

Se agregó 5.5 M ácido clorhídrico en alcohol isopropílico (8.4 L, 5.0 mL/g) a solución de alcohol isopropílico que contiene 4-((3-isopropil-5-metilpirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)piperidin-1-carboxilato de (S)-1-(terc-butoxicarbonil)pirrolidin-3-ilo (819 g) a 20-30 °C. Se calentó la mezcla de reacción a 50-60 °C por 5 horas. Se enfrió a 30-35 °C, se agregó MTBE (8.2 L, 10 mL/g) y se agitó por 1 hora. Se filtró, se agregó la torta húmeda a hidróxido de sodio acuoso (3.0 equiv) a 0-5 °C y se agitó por 30 minutos. Se agregó 2-metiltetrahydrofurano (8.2 L, 10.0 mL/g) y se agitó. Se extrajo la fase orgánica y se lavó con NaCl acuoso saturado. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró bajo presión reducida a 1-2 volúmenes. Se agregó
 20 MTBE (2.46 L, 3 mL/g) y se agitó por 3 horas. La filtración proporcionó el compuesto del título (550 g). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (s, 1H), 6.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.27 - 5.13 (m, 1H), 4.26 - 4.01 (m, 2H), 3.74 - 3.59 (m, 1H), 3.36 - 3.23 (m, 1H), 3.14 - 2.98 (m, 5H), 2.90 (ddd, *J* = 11.1, 8.4, 5.4 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.18 - 2.00 (m,
 25

3H), 1.87 (dd, $J = 12.6, 6.4$ Hz, 1H), 1.76 (s, 1H), 1.66 - 1.52 (m, 2H), 1.34 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).

Síntesis alternativa de [(3S)-pirrolidin-3-il] 4-
[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-
5 il)amino]piperidin-1-carboxilato.

Se agregó fósgeno (1.14 mL, 20 % de masa en tolueno, 3.20 mmol) a una solución fría (0°C) de (3S)-3-hidroxipirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo (500 mg, 2.67 mmol) y TEA (0.37 mL, 2.6 mmol) en THF (13 mL). Se removió el
10 baño enfriante y se agitó la mezcla a TA. Después de 30 minutos, se concentró la mezcla bajo presión reducida y se disolvió el residuo en DCM (11 mL). Se agregó esta solución a una solución de 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (C, 365 mg, 100 %
15 de masa, 0.365 g) y TEA (0.3 mL) en DCM (11 mL). Se agitó la mezcla a TA. Después de 10 minutos, se agregó solución de NaHCO₃ acuosa saturada y se extrajo con más DCM. Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con NaCl acuoso saturado, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se
20 concentró bajo presión reducida para dar un residuo. Se purificó el residuo por cromatografía instantánea (gel de sílice), eluyendo con DCM: MeOH para proporcionar 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-terc-butoxicarbonilpirrolidin-3-il] (671 mg) como un aceite

amarillento. Espectro de masa (m/z): 487(M+1).

Se agregó por goteo ácido trifluoroacético (2 mL, 26.45 mmol) a una solución de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de

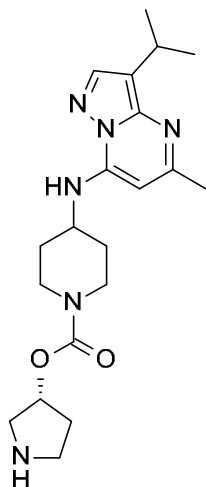
5 [(3S)-1-terc-butoxicarbonilpirrolidin-3-il] (671 mg, 1.269 mmol) en DCM (12 mL). Se agitó a TA. Después de 18 horas, se concentró la mezcla bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en DCM y se lavó la fase orgánica con 10% de solución acuosa de K₂CO₃. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de

10 magnesio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar [(3S)-pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato (274 mg, 0.6593 mmol) como una espuma blanca. Espectro de masa (m/z): 387(M+1). ¹H NMR (400.13 MHz, d₆-DMSO): 7.87 (s, 1H), 7.42 (d, J= 9.0 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.00 (ddd, J= 9.0, 5.2, 2.5 Hz, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.77 (m, 1 H), 3.13 (m, 1 H), 2.89 (m, 4 H), 2.72 (m, 2H), 2.40 (s, 3 H), 1.87 (dd, J= 6.8, 14.1 Hz, 2 H), 1.63 (m, 3 H), 1.28 (d, J= 6.8 Hz, 6 H).

20 **Preparación 9**

Síntesis de [(3R)-pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato

5



Se agregó fósgeno (1.14 mL, 20 % de masa en
 10 tolueno, 3.20 mmol) a una solución fría (0°C) de (3R)-3-
 hidroxipirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo (500 mg, 2.67
 mmol) y TEA (0.37 mL, 2.6 mmol) en THF (13 mL). Se removi6 el
 ba6o enfriante y se agitó la mezcla a TA.

Después de 30 minutos, se concentró la mezcla bajo
 15 presión reducida y se disolvió el residuo en DCM (11 mL). Se
 agregó esta solución a una solución de 3-isopropil-5-metil-N-
 (4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (365 mg, 100 %
 de masa, 0.365 g) y TEA (0.3 mL) en DCM (11 mL). Se agitó la
 mezcla a TA. Después de 10 minutos, se agregó solución de
 20 NaHCO₃ acuosa saturada y se extrajo con más DCM. Se
 combinaron las capas orgánicas y se lavaron con NaCl acuoso
 saturado se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron,
 y se concentraron bajo presión reducida para dar un residuo.
 Se purificó el residuo por cromatografía instantánea (gel de
 25 sílice), eluyendo con hexano: acetato de etilo para

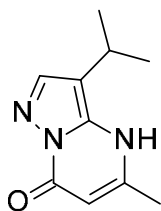
proporcionar 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3R)-1-terc-butoxicarbonilpirrolidin-3-il] (350 mg) como un aceite amarillento. Espectro de masa (m/z): 487(M+1).

5 Se agregó por goteo ácido trifluoroacético (0.8 mL, 0.72 mmol) a una solución de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3R)-1-terc-butoxicarbonilpirrolidin-3-il] (350 mg, 0.72 mmol) en DCM (7 mL). Se agitó a TA. Después de 45 minutos, se
10 concentró la mezcla bajo presión reducida. Se purificó el residuo por elución del cartucho SCX-2 con 10% DCM: MeOH después MeOH (2 N NH₃). Se concentró la fracción básica bajo presión reducida para proporcionar [(3R)-pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato (246 mg) como un sólido
15 marrón. Espectro de masa (m/z): 387(M+1).

Preparación 10

Síntesis de 3-isopropil-5-metil-4H-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-ona

20

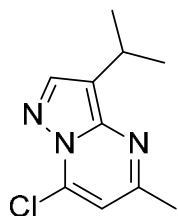


Se disolvió 4-isopropil-1H-pirazol-5-amina (2.2 kg, 17.6 mol) y acetato de etilo (2.86 kg, 1.25 eq.) en ácido
25

acético (17.6 L, 8.0 mL/g.). Se calentó la mezcla a 110-115 °C y después se enfrió a 35-40 °C. Se agregó heptano y MTBE (44 L, 20 mL/g., relación 5/1). Se filtró y se enjuagó lo sólido con heptano (4.4 L, 2 mL/g.) para dar el compuesto del título (2.28 kg, 85.5% de rendimiento). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.81 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.08 - 3.05 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.22 (d, J = 5.0 Hz, 6H).

Preparación 11

Síntesis de 7-cloro-3-isopropil-5-metilpirazol[1,5-a]pirimidina

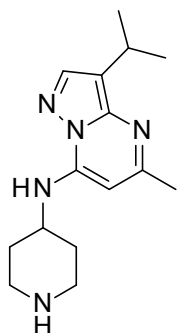


Se disolvió 3-isopropil-5-metil-4H-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-ona (2.1 kg, 11.0 mol) y N,N-dimetilanilina (0.86 kg, 0.65 eq.) en ACN (8.4 L, 4 mL/g.). Se calentó la reacción a 50-55 °C y se agregó POCl₃ (4.2 kg, 2.5 eq.) por goteo. Se ajustó la temperatura a 60-65 °C y se agitó la mezcla por 9 horas. Se enfrió la mezcla a 25-30 °C y se vertió en 2M amortiguador de potasio fosfato (pH=8.0, 42 L, 20 mL/g). Se agregó MTBE (23.9 L, 11.4 mL/g) y se extrajo la fase orgánica. Se lavó la fase orgánica secuencialmente con 20% solución de ácido cítrico (4.2 L, 2.0 mL/g) dos veces, 10% solución acuosa de NaHCO₃ (10.5 L, 5.0 mL/g) y NaCl

acuoso saturado (10.5 L, 5.0 mL/g). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el compuesto del título (1.8 kg, 78% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.02 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.27 - 3.25 (m, 1H), 2.58 (s, 3H), 1.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 6H).

Preparación 12

3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina



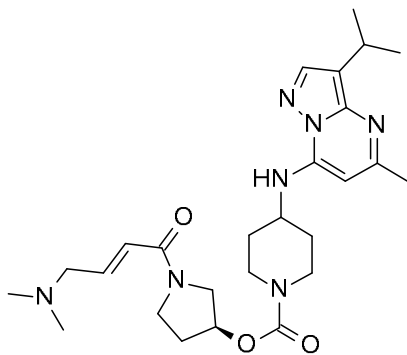
Se agregó diclorhidrato de 3-isopropil-5-metil-N-(4-piperidil)pirazol[1,5-a]pirimidin-7-amina (2.2 kg, 6.4 mol) a 1 M de solución acuosa de hidróxido de sodio (19.2 L, 3.0 eq.) a 10-15 °C. Se agitó la mezcla de reacción por 15-20 minutos después se agregó 2-metiltetrahidrofurano (4.70 L, 10.0 equiv) y se agitó por 20-25 minutos. Se separó la fase orgánica y se lavó la fase acuosa con 2-metiltetrahidrofurano (6.6 L, 3.0 mL/g, 3 veces). Se combinaron las soluciones orgánicas y se lavaron con NaCl acuoso saturado (11 L, 5.0 mL/g). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró, y se

concentró bajo presión reducida. Se agregó MTBE (6.6 L, 3.0 mL/g) y se agitó por 40 minutos a 25-30 °C. La filtración proporcionó el compuesto del título (1.5 kg, 85.7% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (s, 1H), 6.10 (d, *J* = 8.0 Hz 1H), 5.75 (s, 1H), 3.59-3.54 (m, 1 H), 3.32-3.28 (m, 1 H), 3.22-3.19 (m, 2 H), 2.77-2.73 (m, 2 H), 2.51 (s, 3H), 2.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.56-1.50 (m, 3 H), 1.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 6H).

Ejemplo 1

Síntesis de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il].

15



(II)*

[*Nótese que como se muestra en el Ejemplo 1, el centro quiral ha cambiado de orientación y la forma de enantiómero S es representada diferencialmente como se muestra anteriormente los ejemplos en la estructura (II).] Se agregó clorhidrato del ácido (E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (15.0 g, 90.3 mmol, 1.2 eq), N,N-diisopropiletilamina (31.3

mL, 23.4 g, 181 mmol, 2.4 eq), y HATU (42.9 g, 113 mmol, 1.5 eq) a una suspensión de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-pirrolidin-3-il] (29.1 g, 75.3 mmol) en THF (146 mL) a 23 °C, y se agitó la mezcla por 90 minutos. Se diluyó con amortiguador de fosfato (0.5 M, pH = 9, 150 mL), se extrajo con DCM (2 x 375 mL), se secó (MgSO₄), y se concentró in vacuo. Se purificó el residuo resultante (ca. 95 g) por cromatografía (el residuo de carga se disolvió en 65 mL de DCM; 330 g de SiO₂; eluyente: MTBE / 7N NH₃ en MeOH 0% a 10%; TLC: MTBE / 7N NH₃ en MeOH 5:1). Se disolvió el material (ca. 40 g) en DCM (400 mL), se lavó con 1 M K₂HPO₄ acuoso (1 M, 80 mL), se secó (MgSO₄), y se concentró in vacuo. Se purificó el residuo (ca. 38 g) por cromatografía (residuo de carga absorbido en SiO₂ (50 g); 330 g de SiO₂; eluyente: MTBE / 7N NH₃ en MeOH 0% a 10%) para obtener [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato (28.1 g, 75%) como un sólido blanco. ES/MS m/z 498 (M+H). ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.33 (d, 6H), 1.64 (m, 2H), 2.10 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.50 (s, 3H), 3.11 (m, 2H), 3.18 (dd, 2H), 3.29 (dq, 1H), 3.70 (m, 3H), 3.87 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 5.31 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 6.47 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 7.88 (s, 1H). [α]_D²⁰ = +49.9 ° (C=2.0, MeOH). Exceso enantiómerico (ee) = 97%. Rt (tiempo de

retención) = 2.79 minutos (UV); Columna LC: CHIRALPAK® AS (4.6 x 150 mm, 5 µm); MeOH + 0.2% DMEA; Velocidad de Flujo: 1.0 mL/min.

Síntesis alternativa de 4-[(3-isopropil-5-metil-
5 pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il].

Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0.36 mL, 2.1 mmol,) a una solución de 4-[(3-isopropil-5-metil-
pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de
10 [(3S)-pirrolidin-3-il] (170 mg, 0.4091 mmol), clorhidrato del ácido (E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico; (135 mg, 0.81512 mmol) y HATU (317 mg, 0.8181 mmol) en N,N-dimetilformamida (4 mL). Se agitó a TA. Después de 5 minutos, se concentró la mezcla bajo presión reducida. Se purificó el residuo por
15 cartucho SCX-2 eluyendo con 10% DCM: MeOH después MeOH (2N NH₃). Se concentró la fracción básica bajo presión reducida y se purificó el residuo a través de Claricep series C de fase inversa ISCO™ eluyendo con NH₄CO₃ pH 9/ACN para proporcionar 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-
20 il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] (129 mg, 0.255 mmol) como un sólido blanco. Espectro de masa (m/z): 498 (M+1). ¹H NMR (400.13 MHz, MeOD): 7.88 (s, 1H), 6.85 (m, 1 H), 6.47 (m, 1 H), 6.12 (s, 1 H), 3.91-3.52 (m, 5 H), 3.13
25 (m, 1 H), 3.03 (m, 2 H), 2.94 (m, 1 H), 2.39 (s, 3 H), 2.15

(s, 6 H), 2.06 (m, 1 H), 1.88 (d, $J = 11.5$ Hz, 2 H), 1.66 (m, 2 H), 1.28 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H).

Síntesis alternativa de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de
5 [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il].

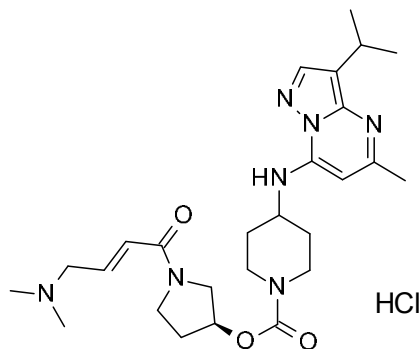
Se disolvió [(3S)-pirrolidin-3-il] 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato (550 g, 1.4 mol) en THF (5.5 L, 10.0 mL/g) a 15-30 °C. Se agregó clorhidrato del ácido (E)-4-
10 (dimetilamino)but-2-enoico (278 g, 1.2 eq.) y TEA (1.17 L, 6.0 eq.) a 15-30 °C y se agitó por 40 minutos. Se agregó 50% anhídrido de propilfosfónico en EtOAc (1.68 L, 1.2 equiv) a 15-30 °C y se agitó por 12 horas. Se filtró y el solvente intercambió lo filtrado con acetato de isopropilo bajo
15 presión reducida. Se agregó 2 M NaOH acuoso (2.75 L, 5 mL/g) y se agitó por 20 minutos a 25-30 °C. Se extrajo la fase orgánica y se lavó con NaCl acuoso saturado (2.75 L, 5 mL/g). Se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se concentró bajo presión reducida. Se agregó heptano (3.85 L, 7 mL/g) y THF (16.5 L, 3
20 mL/g) a 15-30 °C. Se agitó por 1 hora y se filtró para proporcionar el compuesto del título (440 g, 63.2% de rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.86 (s, 1H), 6.83 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 6.43 (dd, $J = 34.3, 14.9$ Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.26 (d, $J = 24.2$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.22 - 4.01 (m, 2H), 3.90 - 3.76 (m, 2H), 3.61 - 3.47 (m, 1H), 3.36 - 3.21

(m, 2H), 3.17 - 3.11 (m, 2H), 3.12 - 2.98 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.28 - 2.21 (m, 7H), 2.16 - 2.00 (m, 3H), 1.68 - 1.48 (m, 2H), 1.30 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H).

Ejemplo 2

5 Síntesis de clorhidrato 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il].

10



(II)*

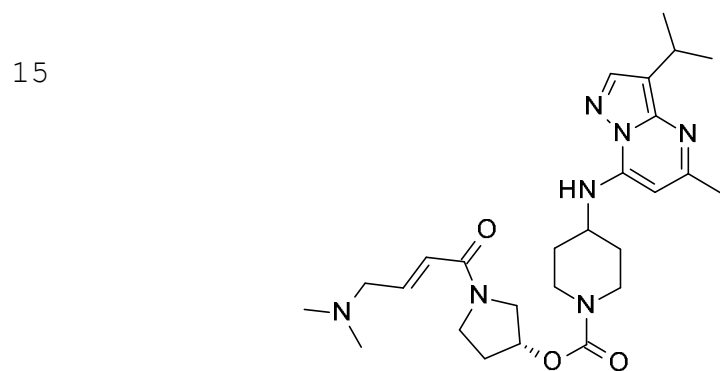
15 [*Nótese que como se muestra en la presente en el Ejemplo 2, el centro quiral ha cambiado de orientación y la forma del enantiómero S es representado diferencialmente que como se muestra anteriormente en los Ejemplos en la estructura (II).] Se agregó HCl (1 M en EtOAc (0.589 mL, 20 0.590 g, 0.589 mmol, 1.07 eq) a una solución de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] (0.283 g, 0.549 mmol) en acetona (5.5 mL) a 23 °C, y se agitó la mezcla por 5 25 horas. Se concentró in vacuo para obtener clorhidrato de 4-

[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] (0.244 g, 81%) como un sólido blanco. ES/MS m/z 498 (M+H).

¹H NMR (CD₃OD) δ 1.34 (d, 6H), 1.66 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 2.20 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.90 (s, 6H), 3.12 (m, 2H), 3.28 (dq, 1H), 3.74 (m, 4H), 3.95 (dd, 2H), 4.16 (m, 2H), 4.63 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.78 (m, 2H), 7.94 (s, 1H).

10 Ejemplo 3

Síntesis de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3R)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il].



20 (III)*

[*Nótese que como se muestra en la presente en el Ejemplo 3, el centro quiral ha cambiado de orientación y la forma del enantiómero R es representada diferencialmente que como se muestra anteriormente en los Ejemplos en la estructura (II).] Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0.4 mL,

25

2.0 mmol,) a una solución de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3R)-pirrolidin-3-il] (170 mg, 0.43 mmol), clorhidrato del ácido (E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (150 mg, 0.90 mmol) y
 5 HATU (343 mg, 0.87 mmol) en DMF (4 mL). Se agitó a TA. Después de 5 minutos, se concentró la mezcla bajo presión reducida. Se purificó el residuo por cartucho SCX-2 eluyendo con 10% DCM: MeOH después MeOH (2 N NH₃). Se concentró la fracción básica bajo presión reducida y se purificó el
 10 residuo a través de ISCO Claricep Series C de ase inversa eluyendo con NH₄CO₃ pH 9/ACN para proporcionar 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3R)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] (188 mg) como un
 15 sólido blanco. Espectro de masa (m/z): 498 (M+1).

¹H NMR (400.21 MHz, DMSO): 7.86 (s, 1 H), 7.41 (m, 1 H), 6.63 (m, 1 H), 6.37 (m, 1 H), 6.13 (s, 1 H), 5.16 (m, 1H), 4.09-3.92 (m, 2H), 3.78 (m, 2 H), 3.56 (m, 2 H), 3.13 (m, 1 H), 3.03 (m, 2 H), 2.93 (m, 1 H), 2.39 (s, 3 H), 2.14 (s, 6
 20 H), 2.06 (m, 1 H) 1.88 (m, 2 H), 1.60 (m, 2 H), 1.28 (d, J= 6.8 Hz, 6 H).

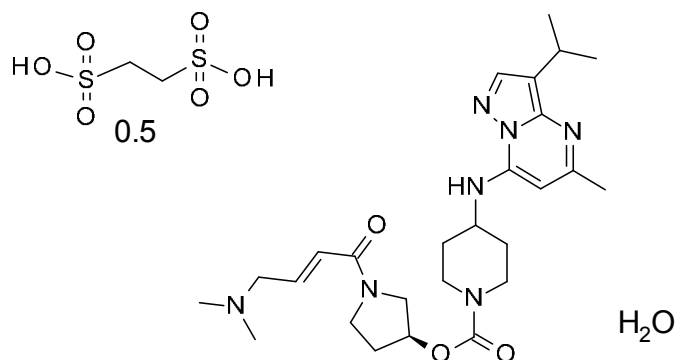
Ejemplo 4

Síntesis de hidrato hemi-edisilato de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato [(3S)-1-[(E)-4-

25

(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] cristalino

5



(II)*

[*Nótese que como se muestra en el Ejemplo 4, el
 10 centro quiral ha cambiado de orientación y la forma del
 enantiómero S es representado diferencialmente que como se
 muestra anteriormente los Ejemplos en la estructura (II). Se
 colocó 2.0 g de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-
 a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-
 15 [(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] en 8 mL de
 acetona mientras se agitó magnéticamente a temperatura
 ambiente. En un vial separado, se disolvió 505 mg de hidrato
 del ácido 1,2-etandisulfónico en 6 mL de acetona. Se agregó
 la solución del ácido a la solución de base libre y se mezcló
 20 a TA. Se agitó la mezcla de manera que el mezclado es
 completo, agregando el solvente adicional para adelgazar la
 suspensión si es necesario. Se formó en suspensión durante la
 noche a 50 °C. Después se agitó durante la noche, se enfrió
 la suspensión espesa restante del sólido blanco a 20 °C. Se
 25 aislaron los sólidos por filtración a vacío en papel filtro y

se secó la torta resultante del sólido blanco colocada en el papel filtro (2.1 g, 88% de rendimiento).

Para obtener los patrones XRD del sólido cristalino en un difractómetro en polvo de rayos X Endeavor Bruker D4, equipado con una fuente CuK α ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. La muestra se barrió entre 4 y 40° en 2θ , con un tamaño de etapa de 0.008° en 2θ y una velocidad de barrido de 0.5 segundos/etapa, y con 0.6 mm de divergencia, 5.28 antidispersión fijo, y 9.5 mm de ranuras del detector. Se empaquetó el polvo seco en un portador de muestra de cuarzo y para obtener una superficie lisa usando un portaobjeto. Se recolectaron los patrones de difracción en forma de cristal a temperatura ambiente y humedad relativa. Es bien conocido en la técnica de cristalografía que, para cualquier forma de cristal dado, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de los factores tales como morfología y hábito del cristal. Cuando los efectos de la orientación preferida están presentes, las intensidades del pico son alteradas, pero las posiciones del pico característico del polimorfo están sin cambio. Véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, páginas 1843-1844, 1995. Además, es también bien conocido en la técnica de cristalografía que cualquier cristal dado forma las posiciones del pico angular pueden

variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones del pico pueden cambiar debido a una variación en la temperatura y humedad a la cual se analiza una muestra, desplazamiento de muestra o la presencia o ausencia de un estándar interno. En el presente caso, una variabilidad en la posición del pico de ± 0.2 en 2θ puede tomar en cuenta estas variaciones potenciales dificultando la identificación inequívoca de la forma del cristal indicado. La confirmación de una forma de cristal se puede hacer con base en cualquier combinación única de los picos distinguibles de $^\circ 2\theta$), típicamente los picos más prominentes. Se ajustaron los patrones de difracción de la forma de cristal, recolectadas a temperatura ambiente y humedad relativa, con base en los picos estándar NIST 675 a 8.853 y 26.774 grados en 2θ .

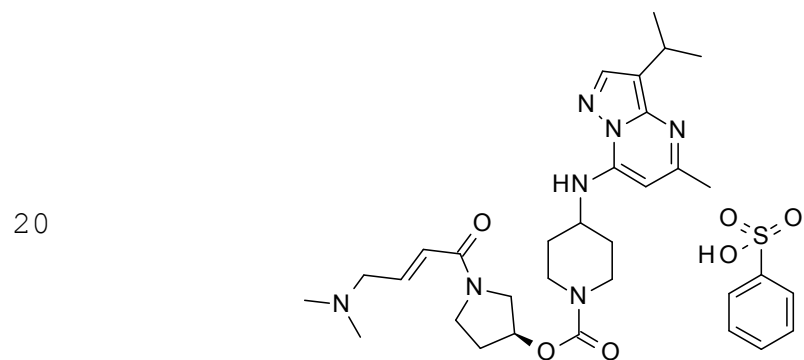
Se caracterizó una muestra preparada del hidrato de hemi-edisilato cristalino por un patrón XRD usando radiación CuK α que tiene picos de difracción (valores 2θ) como se describe en la tabla a continuación, y en particular que tiene un pico a 18.5° en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste de 21.5° , 16.7° y 15.2° ; con una tolerancia para los ángulos de dilatación de 0.2 grados.

Picos de difracción en polvo de rayos X del hidrato de hemi-edisilato cristalino.

5		Hidrato de Hemi-edisilato cristalino	
	Pico	Angulo (°2-Theta) +/- 0.2°	Intensidad Relativa (% del pico más intenso)
	1	7.0	14.90%
	2	10.3	36.50%
	3	12.6	14.50%
	4	15.2	47.70%
	5	16.7	58.40%
	6	18.5	100.00%
	7	19.8	16.10%
	8	21.5	63.20%
10	9	23.2	17.50%
	10	24.3	10.90%

Ejemplo 5

Síntesis de besilato de 4-[(3-isopropil-5-metil-
pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de
15 [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il]
cristalino



(II) *

[*Nótese que como se muestra en la presente en el
25 Ejemplo 5, el centro quiral ha cambiado de orientación y la

forma del enantiómero S es representada diferencialmente como muestran anteriormente los ejemplos en la estructura (II).] Se colocó 1998 mg de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-
5 [(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] en 15 mL de acetona mientras se agitó a 1000 rpm a TA. Se agregó 650 mg de ácido bencensulfónico (disuelto en 5 mL de acetona). Se agitó la muestra a 1000 rpm a TA por una hora, y después de algún tiempo, la solución se volvió turbia, y una suspensión
10 espesa resultó de los sólidos blancos. Se aisló lo sólido blanco por filtración a vacío en papel filtro. Se secó la muestra en el horno a vacío por 1 hora a 70°C (2.23 g, 85% de rendimiento).

Síntesis de besilato de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il]
15 cristalino

Se disolvió 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-
20 [(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] (440 g, 1.1 mol) en EtOAc (1.4 L) y acetona (357 mL) a 15-30 °C. Se calentó a 50-55 °C. Se disolvió monohidratado del ácido bencensulfónico (156 g, 0.89 eq.) en EtOAc (709 mL) y acetona (166 mL) y se agregó a la mezcla de reacción a 5-10
25 mL/minutos a 50-55 °C. Se agitó por 1 hora. Se enfrió a 15-30

°C y se agitó por 12 horas. Se filtró y se secó la torta húmeda bajo nitrógeno para proporcionar el compuesto del título (525 g 72.9% de rendimiento). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.89 (s, 1H), 7.85 - 7.79 (m, 2H), 7.43 - 7.39 (m, 3H),
5 6.82 - 6.66 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.27 (d, J = 21.5 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 32.9 Hz, 2H), 3.94 - 3.79 (m, 4H), 3.33 - 3.18 (m, 2H), 3.10-2.97 (m, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.49 (s, 3H), 2.25 - 1.94 (m, 5H), 1.68 - 1.51 (m, 2H), 1.31 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

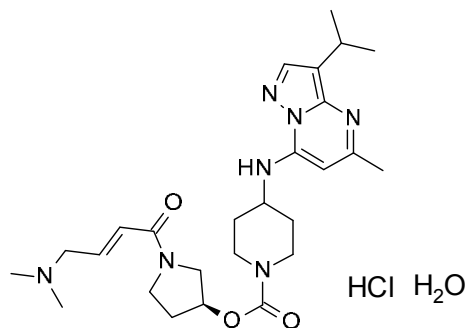
10 Se obtuvieron los patrones XRD de lo sólido cristalino esencialmente como se describe en el Ejemplo 4. Se caracterizó una muestra preparada del besilato cristalino por un patrón XRD usando radiación CuKα que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la tabla a
15 continuación, y en particular que tiene un pico a 21-5° en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste de 12.4°, 17.3°, y 15.8°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

 Picos de difracción en polvo de rayos X del
20 besilato cristalino

Besilato Cristalino		
Pico	Angulo ($^{\circ}2\text{-Theta}$) +/- 0.2 $^{\circ}$	Intensidad Relativa (% del pico más intenso)
1	6.3	46.30%
2	9.5	26.30%
3	10.7	26.30%
4	12.4	98.70%
5	15.8	52.00%
6	16.5	45.20%
7	17.3	56.60%
8	21.5	100.00%
9	23.4	36.80%
10	24.9	32.10%

Ejemplo 6

Síntesis de clorhidrato de 4-[(3-isopropil-5-metilpirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de
 [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il]
 cristalino



(II) *

[*Nótese que como se muestra aquí en el Ejemplo 6,
 el centro quiral ha cambiado de orientación y la forma del

enantiómero S es representado diferencialmente como se muestra en los ejemplos en la estructura (II).] Se colocó 557 mg de 4-[(3-isopropil-5-metil-pirazol[1,5-a]pirimidin-7-il)amino]piperidin-1-carboxilato de [(3S)-1-[(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoil]pirrolidin-3-il] en 4 mL de acetona mientras se agita a 1000 rpm a TA. Se agregó 1200 µL de HCl (1M en acetato de etilo, 1.07 eq.). Se agitó la muestra a 1000 rpm durante la noche para dar una suspensión espesa del sólido blanco. Se aisló lo sólido blanco por filtración a vacío en papel filtro. Se secó la torta resultante de lo sólido blanco en lugar del filtro bajo corriente de aire por 10 minutos (385 mg, 64% de rendimiento).

Para los patrones CRD del sólido cristalino esencialmente como se describe en el Ejemplo 4. Se caracterizó una muestra preparada del hidrato de clorhidrato cristalino por un patrón XRD usando radiación CaK α por tener picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la tabla a continuación, y en particular por tener un pico a 18.9° en combinación con uno o más picos seleccionados del grupo que consiste de 5.5°, 15.5°, y 9.7°; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0.2 grados.

Picos de difracción en polvo de rayos X del clorhidrato cristalino

5	Clorhidrato Cristalino		
	Pico	Angulo ($^{\circ}2$ -Theta) +/- 0.2 $^{\circ}$	Intensidad Relativa (% del pico más intenso)
	1	5.5	79.40%
	2	6.2	54.40%
	3	9.2	31.50%
	4	9.7	56.10%
	5	11.1	26.70%
	6	14.2	29.80%
	7	15.5	61.70%
	8	18.9	100.00%
10	9	19.5	30.80%
	10	23.4	40.40%

Ensayos Biológicos

Los siguientes ensayos demuestran que un compuesto de la invención es un inhibidor de la actividad de CDK7. Los resultados de los ensayos también muestran que un compuesto de la invención inhibe la proliferación en líneas de células de cáncer y crecimiento del tumor en el modelo de tumor de injerto heterólogo de cáncer.

"IC₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce 50% de la respuesta inhibidora máxima posible para tal agente o, alternativamente, a la concentración de un agente el cual produce 50% de desplazamiento del ligando específico que se une al receptor; los valores IC₅₀ relativos se determinan usando unidad de fluorescencia calculando el porcentaje de inhibición con respecto a controles "MIN" y

“MÁX” en la placa y después ajustando los datos de respuesta de dosis de diez puntos a una ecuación logística de cuatro parámetros.

Ensayos de Actividad de Cinasa CDK7 y CDK9

5 El propósito de este ensayo es medir la capacidad de un compuesto de la invención para inhibir la actividad de cinasa del complejo CDK7/CyclinH/Mat1. Para demostrar si los compuestos incluidos dentro de la presente invención presentan afinidad para CDK7, CDK7 y CDK9, se realizaron los
10 ensayos bioquímicos sin preincubación de la enzima con el compuesto o con preincubación de 3 horas. Los ensayos funcionales proporcionan soporte en si los compuestos de la presente invención exhiben la capacidad para inhibir las actividades de cinasa CDK7 y CDK9. Todos los ligandos,
15 solventes y reactivos empleados en los siguientes ensayos son fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales, o pueden ser fácilmente sintetizados por un experto en la técnica. La determinación de IC_{50} para CDK7 y CDK9 se determina como sigue.

20 Ensayo Bioquímico para la Inhibición de CDK7/CyclinH/MAT1

La actividad de IC_{50} del inhibidor se determinó usando ensayos de unión de filtro de radioetiqueta (FB) usando la enzima recombinante humana purificada en la
25 presencia de ATP//[^{33}P]ATP y sustrato peptídico. Las

concentraciones de ATP elegidas están en, o cerca del K_m de la enzima para ATP.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de poliestireno de 96 cavidades en un volumen final de 25 μL por cavidad. 5 μL del compuesto de prueba en 20% de DMSO, 10 μL de solución de sustrato (corriente ATP/ ^{33}P ATP y CDK7/9) y 10 μL de solución de la enzima se mezclaron. La solución del sustrato se preparó para dar una concentración final de 100 μM de ATP/ ^{33}P ATP (NEN 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$, 3000 Ci/mmol) y 250 μM de péptido CDK7/9 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO: 1)) diluido en amortiguador de cinasa de 4 mM de MgCl_2 , 0.01% de TRITONTM X-100, 2 mM de DTT y 20 mM de HEPES. La solución enzimática se preparó para una concentración final de 1nM de enzima CDK7/CyclinH/Mat1 [Proquinase 0366-0360-4 Lote 002]] diluida en amortiguador de cinasa. Los compuestos de prueba se diluyeron serialmente 1:3 en 20% de DMSO para crear una curva de 10 puntos a una concentración de partida de 20 μM . 20% de amortiguador DMSO solo sin compuesto de prueba se empleó como control alto (actividad completa en la ausencia de cualquier inhibidor), 500 mM de EDTA se usaron para determinar el nivel de antecedente en la ausencia de actividad enzimática (control bajo). Después del mezclado 5 μL de compuestos con 10 μL de solución enzimática de la placa se incubaron por 0 u 180 minutos a 22 °C. Después de tal tiempo la reacción se inició por la adición de 10 μL de

solución de sustrato e incubó por 50 minutos a 22 °C. La
 reacción se terminó por la adición de 80 µL de solución
 ortofosfórica al 10% fría. Las placas de filtro (placas de
 filtro no estériles, opacas) se prelavaron con 10 µL de
 5 solución ortofosfórica al 10% a cada cavidad. 100 µL de la
 mezcla se transfirieron a un filtro de fosfocelulosa e incubó
 a temperatura ambiente por 45 minutos. Las placas de filtro
 se lavaron con 200 µL de 0.5 % de ácido ortofosfórico 3 veces
 en un procesador de placa de filtro. La incorporación de ^{33}Pi
 10 (conteo de "cpm") se determinó agregando 80 µL de MICROSCINT™
 a cada cavidad y se leyó en un contador después de una hora.
 Los datos se procesaron a través de una herramienta GENEDATA
 SCREENER®. Los datos son analizados usando una ecuación
 logística no lineal de 4 parámetros (curva de respuesta de
 15 concentración logística de cuatro parámetros): $Y = \text{fondo} +$
 $[(\text{superior-fondo}) / (1 + (x / \text{IC}_{50})^{\text{inclinación}})]$ donde $Y = \%$
 inhibición, $X =$ concentración proporcionando $y\%$ de
 inhibición, Fondo = valor mínimo de y logrado por la curva,
 Superior = valor máximo de y logrado por la curva e
 20 Inclinación = pendiente de la curva a IC_{50} . $\% \text{ de Inh} =$
 $[(\text{mediana Máx} - x / \text{mediana Máx} - \text{median Min})] \cdot 100$

IC_{50} : concentración del compuesto que reduce una
 respuesta dada (unión de ligando, respuesta enzimática) por
 50%.

25 Los compuestos descritos en los Ejemplos 1 y 3

presentan una IC_{50} de 0.0173 μM y 0.0487 μM en CDK7 sin preincubación, respectivamente. Después de 3 horas de preincubación de la enzima CDK7 con los Ejemplos 1 y 3, mostraron una IC_{50} de 0.00237 μM y 0.00506 μM ,
5 respectivamente. Estos datos muestran que ambos Ejemplos 1 y 3 inhiben a CDK7.

Ensayo para la Inhibición de la Actividad de Cinasa CDK9/CyclinT1:

La IC_{50} de la actividad del inhibidor se determinó
10 usando ensayos de unión de filtro de radioetiqueta (FB) usando la enzima recombinante humana purificada en la presencia de ATP y sustrato peptídico. Las concentraciones de ATP elegidas están en, o cerca del K_m de la enzima para ATP. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de poliestireno
15 de 96 cavidades en un volumen final de 25 μL por cavidad. 5 μL del compuesto de prueba en 20% de DMSO, 10 μL de solución de sustrato (corriente ATP//[^{33}P]ATP y CDK7/9) y 10 μL de solución de la enzima se mezclaron. La solución del sustrato se preparó para dar una concentración final de 100 μM de
20 ATP/[^{33}P]ATP (NEN 10uCi/ μL , 3000 Ci/mmol) y 200 μM de péptido CDK7/9 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (SEQ ID NO: 1)) diluido en amortiguador de cinasa de 4 mM de $MgCl_2$, 0.0025% de TRITON™ X-100, 1.58 mM de DTT y 15.80 mM de HEPES. La solución enzimática se preparó para una concentración final
25 de 7.5 nM de enzima CDK9/cyclinT1 [Proqinase 0371-0345-1

(Lote 004)] diluida en amortiguador de cinasa. Los compuestos de prueba se diluyeron serialmente 1:3 en 20% de DMSO para crear una curva de 10 puntos a una concentración de partida de 20 μM . 20% de amortiguador DMSO solo sin compuesto de prueba se empleó como control alto (actividad completa en la ausencia de cualquier inhibidor), 500 mM de EDTA se usaron para determinar el nivel de antecedente en la ausencia de actividad enzimática (control bajo). Después del mezclado 5 μL de compuestos con 10 μL de solución enzimática de la placa se incubaron por 0 u 180 minutos a 22 °C. Después de tal tiempo la reacción se inició por la adición de 10 μL de solución de sustrato e incubó por 60 minutos a 22 °C. La reacción se terminó por la adición de 80 μL de solución ortofosfórica al 10% fría. Las placas de filtro (placas de filtro no estériles, opacas) se prelavaron con 10 μL of 10% de solución ortofosfórica por cavidad. 100 μL de la mezcla se transfirieron a un filtro de fosfocelulosa e incubaron a temperatura ambiente por 45 minutos. Las placas de filtro se lavaron con 200 μL 0.5 % de ácido ortofosfórico 3 veces en un procesador de placa de filtro. 80 μL de MICROSCINT™ se agregaron a cada cavidad y se leyeron en un contador de escintilación después de una hora. Los datos se procesaron a través de una herramienta GENEDATA-SCREENER®. Los datos se analizaron usando una ecuación logística no lineal de 4 parámetros (curva de respuesta de concentración logística de

cuatro parámetros): $Y = \text{fondo} + [(\text{superior-fondo}) / (1 + (x / \text{IC}_{50})^{\text{inclinación}})]$ donde $Y = \% \text{ inhibición}$, $X = \text{concentración}$ proporcionando $y\%$ inhibición, Fondo = valor mínimo de y logrado por la curva, Superior = valor máximo de y logrado por la curva e Inclinación = pendiente de la curva a IC_{50} . % de Inh = $[(\text{mediana Máx} - x / \text{mediana Máx} - \text{median Min})] \cdot 100$
 IC_{50} : concentración del compuesto que reduce una respuesta dada (unión de ligando, respuesta enzimática) por 50%. IC_{50} relativa: concentración que proporciona la mitad de la respuesta máxima del compuesto.

Los compuestos descritos en los Ejemplos 1 y 3 presentan una IC_{50} de 5.93 μM y 2.45 μM para CDK9 (3 horas de preincubación), respectivamente. Estos datos muestran que los Ejemplos 1 y 3 no inhiben potentemente la actividad de CDK9.

Tomados en conjunto, los datos a partir de los ensayos anteriores demuestran que los compuestos de los Ejemplos 1 y 3, inhiben selectivamente a CDK7 sobre CDK9.

Ensayos Mecanísticos de Células CDK7 y CDK9

El propósito de estos ensayos es medir la capacidad de los compuestos para inhibir la señalización de CDK7 y CDK9 en células cancerosas *in vitro*.

Ensayo Acumen a Base de Células p-CTD (S2) del Dominio Terminal Fosfo-Carboxilo (Rbp2) (Ser2)

Células HCT116 (ATCC CCL-247) se cultivaron en Medio 5A de McCoy modificado con medio suplementado con 10%

de FBS, 1% de NaPir y 1% de Pen/Estrep y se plaqueó (previo a volverse 70% de confluyente) en placas de fondo plano de 96 cavidades a una densidad de 5,000 células por cavidad en 100 μ L de volumen. Las células entonces se incubaron durante la
5 noche en una incubadora de cultivo celular (5% de CO₂, 95% de Humedad Relativa (RH) y 37 °C) y permitieron unirse a la placa. A la siguiente mañana las células se dosificaron con los compuestos. Los compuestos inhibidores son primero solubilizados a 60 μ M en medio de cultivo que contiene 0.6%
10 de DMSO. Subsecuentemente diluciones seriales del compuesto (1:3) se prepararon sobre un intervalo de 60 μ M hasta 0.003 μ M. Las células se dosificaron con la adición de 50 μ L de la placa de dilución serial a la placa de ensayo que contiene células unidas con 100 μ L de medio que produce una
15 concentración final de DMSO de 0.2% con un intervalo de dosis de concentración de compuesto final entre 20 y 0.001 μ M. Para el punto máximo se usó medio que contiene 0.2% de DMSO y para el punto mínimo, se usó un compuesto de referencia diluido a 0.83 μ M de concentración final en el medio de crecimiento que
20 contiene 0.2% de DMSO. Después de la dosificación con los compuestos, las placas celulares se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 4 horas. El medio de crecimiento se removió cuidadosamente y las células se fijaron agregando 100 μ L de 4% de para-formaldehído por 30 minutos a RT. Las células se
25 lavaron una vez con PBS e incubaron con 100 μ L de MeOH frío

por 15 minutos a RT para permeación celular. Las células se lavaron dos veces con PBS (100 µL/cada una) y se bloqueó con 100 µL/cavidad de 1% de BSA/PBS por 30 minutos a RT. Se agregaron 50 µL de anticuerpo primario de dilución 1:1000
5 (Anti-phospho CTD Ser2 Abcam, cat# ab5095-100) en 1% de BSA/PBS por cavidad, las placas se sellaron e incubaron durante la noche a 4 °C.

Al siguiente día las células se lavaron tres veces con PBS (100 µL/cavidad) e incubó con 50 µL/cavidad de
10 anticuerpo secundario (dilución 1:2000, IgM anti-conejo de cabra ALEXA FLUOR™ 488) en PBS por 1 hora a RT. Después de lavar 3X con PBS (100 µL/cavidad), 100 µL de 50 µg/mL de ARNase y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio en PBS se agregaron por cavidad. Las placas se sellaron e incubaron 1
15 hora a RT en el banco de pruebas (preservado de la luz). Las placas se analizaron en Acumen en FL2 (intensidad media), y FL3 (intensidad total). La fluorescencia de las placas se barrió con ACUMEN EXPLORER™ [Citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser manufacturado por TTP LABTECH
20 LTD] para medir el dominio anti-fosfo-carboilo terminal en Serina 2 (pCTD). El análisis de imagen se basa en las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Las células positivas pCTD (S2) se identificaron por intensidad media a 500-530 arriba del umbral. Intensidad
25 total a 575-640 a partir de ADN/yoduro de propidio se usó

para identificar células individuales. El rendimiento del ensayo es el % de células positivas pCTD.

La IC_{50} se determinó por ajuste de curva a una logística de cuatro parámetros para cada salida usando GENE DATA™. Los compuestos descritos en los Ejemplos 1 y 3 presentan una IC_{50} >20 μ M y 3.52 μ M relativa para phosphoCTD (S2), respectivamente. Estos datos muestran que ambos Ejemplos 1 y 3 no inhiben potentemente a CDK9 en las células.

Ensayo Acumen a Base de Células p-CTD (S5) del
10 **Dominio Fosfo-Carboxilo Terminal (Rbp2) (Ser5)**

Células HCT116 (ATCC CCL-247) se cultivaron en Medio 5A de McCoy modificado con medio suplementado con 10% de FBS, 1% de NaPir y 1% de Pen/Estrep y se plaqueó (previo a volverse 70% de confluyente) en placas de fondo plano de 96
15 cavidades a una densidad de 5,000 células por cavidad en 100 μ L de volumen. Las células se incubaron durante la noche en una incubadora de cultivo celular (5% de CO_2 , 95% de Humedad Relativa (RH) y 37 °C) y permitieron unirse a la placa. A la siguiente mañana, las células son dosificadas con los
20 compuestos. Los compuestos inhibidores son solubilizados a 60 μ M en medio de cultivo que contiene 0.6% de DMSO. Subsecuentemente diluciones seriales del compuesto (1:3) se prepararon sobre un intervalo de 60 μ M hasta 0.003 μ M. Las células se dosificaron con la adición de 50 μ L a partir de la
25 placa de dilución serial a la placa de ensayo que contiene la

célula unidad con 100 μ L de medio que produce una concentración final de DMSO de 0.2% con un intervalo de dosis de concentración de compuesto final entre 20 y 0.001 μ M. Para el punto máximo se usó medio que contiene 0.2% de DMSO y para el punto mínimo, se usó un compuesto de referencia diluido a 0.83 μ M de concentración final en el medio de crecimiento que contiene 0.2% de DMSO. Después de la dosificación con los compuestos, las placas celulares se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 4 horas. El medio de crecimiento se removió cuidadosamente y las células se fijaron agregando 100 μ L de 4% de para-formaldehído por 30 minutos a RT. Las células se lavaron una vez con PBS e incubó con 100 μ L de MeOH frío por 15 minutos a RT para permeación celular. Nuevamente las células se lavaron dos veces con PBS (100 μ L/cada una) y se bloqueó con 100 μ L/cavidad de 1% de BSA/PBS por 30 min a RT. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo primario a dilución 1:1000 (Anti-phosphoCTD Ser5 Betil Laboratories cat# A300-655A) en 1% de BSA/PBS por cavidad, las placas se sellaron e incubaron durante la noche a 4 °C.

Al siguiente día las células se lavaron tres veces con PBS (100 μ L/cavidad) e incubó con 50 μ L/cavidad de anticuerpo secundario (dilución 1:2000, IgM anti-conejo de cabra ALEXA FLUOR™ 488) en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3X con PBS (100 μ L/cavidad), 100 μ L de 50 μ g/mL ARNase (Sigma) y 1:1000 de dilución de yoduro de

propidio en PBS se agregaron por cavidad. Las placas se sellaron e incubaron por 1 hora a RT en el banco de pruebas (preservado de la luz). Las placas se analizaron en Acumen en FL2 (intensidad media), y FL3 (intensidad total). La fluorescencia de las placas se barrió con ACUMEN EXPLORER™ [Citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser manufacturado por TTP LABTECH LTD] para medir el dominio anti-fosfo-carboilo terminal en Serina 5 (pCTD). El análisis de imagen se basa en las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Las células positivas pCTD (S5) son identificadas por intensidad media a 500-530 arriba del umbral. Intensidad total a 575-640 a partir de ADN/yoduro de propidio se usó para identificar células individuales. El rendimiento del ensayo es el % de células positivas pCTD. La IC₅₀ se determinó por ajuste de curva a una logística de cuatro parámetros para cada salida usando GENE DATA™.

Los compuestos descritos en los Ejemplos 1 y 3 presentan una IC₅₀ de 0.148 μ M y 0.198 μ M relativa para pCTD Ser5, respectivamente. Estos datos muestran que ambos Ejemplos 1 y 3 inhiben la actividad celular de CDK7.

Ensayo Acumen a Base de Célula cMyc

Células HCT116 (ATCC CCL-247) se cultivaron en Medio 5A de McCoy modificado con medio suplementado con 10% de FBS, 1% de NaPir y 1% de Pen/Estrep y se plaqueó (previo a volverse 70% de confluyente) en placas de fondo plano de 96

cavidades a una densidad de 5,000 células por cavidad en 100 μL de volumen. Las células entonces se incubaron durante la noche en una incubadora de cultivo celular (5% de CO_2 , 95% de Humedad Relativa (RH) y 37°C) y permitieron unirse a la placa. A la siguiente mañana las células se dosificaron con los compuestos. Los compuestos inhibidores son solublizados a 60 μM en medio de cultivo que contiene 0.6% de DMSO. Subsecuentemente diluciones seriales del compuesto (1:3) se prepararon sobre un intervalo de 60 μM hasta 0.003 μM . Las células se dosificaron con la adición de 50 μL de la placa de dilución serial a la placa de ensayo que contiene la célula unida con 100 μL de medio que produce una concentración final de DMSO de 0.2% con un intervalo de dosis de concentración de compuesto final entre 20 μM y 0.001 μM . Para el punto máximo se usó medio que contiene 0.2% de DMSO y para el punto mínimo, se usó un compuesto de referencia diluido a 0.83 μM de concentración final en el medio de crecimiento que contiene 0.2% de DMSO. Después de la dosificación con los compuestos, las placas celulares se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 por 4 horas. El medio de crecimiento se removió cuidadosamente y las células se fijaron agregando 100 μL de 4% de para-formaldehído por 30 minutos a RT. Las células se lavaron una vez con PBS e incubó con 100 μL de MeOH frío por 15 minutos a RT para permeación celular. Nuevamente las células se lavaron dos veces con PBS (100 μL /cada una) y se bloqueó con 100

μL/cavidad de 1% de BSA/PBS por 30 minutos a RT. Se agregaron 50 μL de anticuerpo primario a dilución 1:1000 (anticuerpo Anti-c-Myc [Y69] Abcam cat# ab32072) en 1% de BSA/PBS por cavidad, las placas se sellaron e incubaron durante la noche a 4 °C. Al siguiente día las células se lavaron tres veces con PBS (100 μL/cavidad) e incubó con 50 μL/cavidad de anticuerpo secundario (dilución 1:2000, IgM anti-conejo de cabra ALEXA FLUOR™ 488) en PBS por 1 hora a RT. Después de lavar 3X con PBS (100μL/cavidad), 100μL of 50 μg/mL ARNase y 1:1000 de dilución de yoduro de propidio (Invitrogene) en PBS se agregaron por cavidad. Las placas se sellaron e incubaron por 1 hora a RT en el banco de pruebas (preservado de la luz). Las placas se analizaron en Acumen en FL2 (intensidad media), y FL3 (intensidad total). La fluorescencia de las placas se barrió con ACUMEN EXPLORER™ [Citómetro de microplaca de fluorescencia de barrido láser manufacturado por TTP LABTECH LTD] para medir el dominio anti-fosfo-carboilo terminal en Serina 5 (pCTD). El análisis de imagen se basa en las señales fluorescentes celulares para identificar células positivas. Las células positivas pCTD (S5) son identificadas por intensidad media a 500-530 arriba del umbral. Intensidad total a 575-640 a partir de ADN/yoduro de propidio se usó para identificar células individuales. El rendimiento del ensayo es el % de células positivas pCTD. La IC₅₀ se determinó por ajuste de curva a una logística de

cuatro parámetros para cada salida usando GENE DATA™.

Los compuestos descritos en los Ejemplos 1 y 3 presentan una IC₅₀ de 0.0828 µM y 0.0573 µM relativa para cMyc. Estos datos muestran que ambos Ejemplos 1 y 3 inhiben la transcripción de cMyc en células HCT116.

Experimento de perfilado de selectividad:

Perfilador ProQinase WT

Se determinó el perfil de inhibición de cinasa del compuesto midiendo los valores de actividad residual a cuatro concentraciones en singlicato en 320 ensayos de proteína cinasa de tipo silvestre. Los compuestos se probaron a 20 µM, 2 µM, 0.2 µM y 0.02 µM en singlicato. La concentración DMSO final en todos los cócteles de reacción (que incluyen controles altos y bajos) es 1%.

Ensayo de Proteína Cinasa

Se usó un ensayo de proteína cinasa radiométrico (33PANQINASE® Activity Assay, ProQinase) para medir la actividad de cinasa de las 320 proteínas cinasas. Todos los ensayos de cinasa se realizaron en FLASHPLATES™ de 96 cavidades en un volumen de reacción de 50 µL. El cóctel de reacción se pipeteó en 4 etapas en el siguiente orden:

1. 10 µL de solución ATP no radioactiva (en H₂O)
2. 25 µL de amortiguador de ensayo/mezcla de [γ-³³P]-ATP
3. 5 µL de muestra de prueba en 10% de DMSO

4. 10 μ L de mezcla de sustrato/enzima

El ensayo para todas las proteínas cinasas contiene 70 mM de HEPES-NaOH pH 7.5, 3 mM de $MgCl_2$, 3 mM de $MnCl_2$, 3 μ M de Na-ortovanadato, 1.2 mM de DTT, ATP (cantidades variables, que corresponden a la ATP-Km aparente de la cinasa respectiva, véase Tabla 1), [γ - ^{33}P]-ATP (aprox. 8×10^5 cpm por cavidad), proteína cinasa (cantidades variables; véase Tabla 1), y sustrato (cantidades variables; véase Tabla 1). Todos los ensayos de PKC (excepto el ensayo PKC- μ y PKC- ν) contienen adicionalmente 1 mM de $CaCl_2$, 4 mM de EDTA, 5 μ g/mL de fosfatidilserina y 1 μ g/mL de 1,2-Dioleil-glicerol. Los ensayos CAMK1D, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D, CAMK2G, CAMK4, CAMKK1, CAMKK2, DAPK2, EEF2K, MILK, MILK2 y MILK3 contienen adicionalmente 1 μ g/mL de Calmodulina y 0.5 mM de $CaCl_2$. Los ensayos PRKG1 y PRKG2 contienen adicionalmente 1 μ M de cGMP. El ensayo ADN-PK contiene adicionalmente 2.5 μ g/mL de ADN.

Los cócteles de reacción de proteína cinasa son incubados a 30 °C por 60 minutos. La reacción se detuvo con 50 μ L de 2% de (v/v) H_3PO_4 , las placas se aspiraron y lavaron dos veces con 200 μ L 0.9% de (p/v) NaCl. La incorporación de ^{33}P i (conteo de "cpm") se determinó en un contador de escintilación de microplaca. Todos los ensayos de proteína cinasa se realizaron con un sistema robótico BeckmanCoulter BIOMEK® 2000/SL. Todas las proteínas cinasas proporcionadas por ProQinase son expresadas en células de insecto Sf9 o en

E.coli como proteínas de GST-fusión recombinante o proteínas etiquetadas con His, ya sea como fragmentos enzimáticamente activos o de longitud completa. Todas las cinasas son producidas a partir de ADNc humanos y purificadas por ya sea cromatografía de afinidad GSH o inmovilizadas por metal. Las etiquetas de afinidad se removieron a partir de un número de cinasas durante la purificación. La pureza de las proteínas cinasas se examinó por teñido de SDS-PAGE/Coomassie, la identidad se comprobó por espectroscopio de masas. Las cinasas de vendedores externos (CAR = Carna Biosciences Inc.; INV = Life Technologies (Invitrogen Corporation™); MIL = Merck-Millipore (Millipore Corporation™), véase Tabla 1) son expresadas, purificadas y controladas de calidad en virtud de las lecturas de los vendedores. Las concentraciones de las enzimas y sustratos para los ensayos se muestran en la Tabla 1.

Evaluación de Datos Sin Procesar

Para cada cinasa, el valor mediano del cpm de tres cavidades se define como "control bajo" (n=3). Este valor refleja la unión no específica de radioactividad a la placa en la ausencia de una proteína cinasa pero en la presencia del sustrato. Adicionalmente, para cada cinasa, el valor mediano del cpm de las otras tres cavidades se toma como el "control alto", es decir, actividad completa en la ausencia de cualquier inhibidor (n=3). La diferencia entre control

alto y bajo de cada enzima se toma como 100% de actividad. Como parte de la evaluación de datos, el control bajo de cada cinasa es sustraído a partir del valor de control alto así como también a partir de sus "valores de compuesto" correspondientes. La actividad residual (en%) para cada compuesto también es calculada usando la siguiente fórmula:
 Actividad Res. (%) = $100 \times [(señal\ del\ compuesto - control\ bajo) / (control\ alto - control\ bajo)]$. Se calcularon IC₅₀ no estándares usando una hoja de cálculo de Excel personalizada en conjunto con el XLFit Add-in. Debido al bajo número de puntos de datos, (4) el XL-Fit se calcula en una IC₅₀ no estándar usando una ecuación de cuatro parámetros donde tres parámetros son bloqueados a los valores ajustados.

La Ecuación es:

$$Y = B + ((A - B)) / [1 + (x/C)]^D$$

A: Valor mínimo de actividad, también conocido como Fondo. Fijado a 0

B: Valor máximo de la actividad, también conocido como Superior. Fijado a 100

C: Punto de inflexión de la curva

D: Inclinação Hill. Fijada a 1

Y: La variable dependiente (es decir, lo que se mide como la señal)

X: La variable independiente (es decir, el control, tal como, dosis, concentración, etc.)

La forma para calcular la IC_{50} No Estándar es asignando valores aleatorios al parámetro C y repetirlos iterativamente. El algoritmo entonces mide las diferencias en la suma de los cuadrados residuales y observará iteraciones consecutivas sucesivas en donde el cambio en los residuales está cubriéndose. Una vez que el límite de convergencia se ha cubierto, la solución es considerada como la óptima y termina el proceso de ajuste.

CDK12 y CDK13 (ProQinase) son probadas esencialmente como anteriormente pero separadamente a 10 concentraciones (2×10^5 M hasta 6×10^{10} M) usando diluciones semi-logarítmicas. Para los 10 puntos, el análisis de las actividades residuales para cada concentración y los valores de IC_{50} del compuesto son calculados usando QUATTRO® WORKFLOW™ V3.1.1. El modelo de ajuste para las determinaciones de IC_{50} fue "respuesta sigmoideal (inclinación variable)" con parámetros "superiores" ajustados a 100% y "fondo" a 0%. El método de ajuste usado fue un ajuste de mínimos cuadrados. Los datos se muestran en la Tabla 1 abajo.

20

25

Tabla 1

Cinasa	Cinasa	Conc. de Cinasa	Conc. ATP	Sustrato	Sustrato	IC50
Nombre	Familia	nM	μ M	Nombre	μ g/50 μ L	μ M
CDK7/CycH/MAT1	CMGC	3.3	3	RBER- CHKtide	2	0.0928
CDK9/CycT1	CMGC	2.2	1	RBER- CHKtide	2	6.32
CDK1/CycB1	CMGC	7	1	RBER- CHKtide	2	20.000
CDK2/CycE1	CMGC	1.5	1	RBER- CHKtide	1	20.000
CDK4/CycD1	CMGC	3.3	3	RBER- CHKtide	2	2.830
CDK6/CycD1	CMGC	3.2	3	RBER- CHKtide	2	8.079
CDK8/CycC	CMGC	8.3	1	RBER- IRStide	1	10.922
CDK16/CycY	CMGC	3.2	0.3	GSK3(14-27)	2	9.073
CDK19/CycC	CMGC	30.9	3	RBER- IRStide	2	7.414
CDK12/CycK	CMGC	14.7	0.3	RBER- IRStide	2	14.780
CDK13/CycK	CMGC	29.2	0.3	RBER- CDC25tide	1	20.000

Estos datos muestran que el compuesto del Ejemplo 1 es muy selectivo para CDK7 a partir de un panel representativo de cinasas.

Ensayo de Proliferación Celular

Los datos en la Tabla 2 muestran que los compuestos del Ejemplo 1 inhiben la proliferación y viabilidad de las líneas de células tumorales especificadas. Las líneas celulares son plaqueadas a la densidad de 5000 células por

cavidad en 100 μ L de medio de crecimiento por cavidad en una placa de cultivo celular de 96 cavidades blanca. Véase Tabla 2 para información del medio de cultivo y línea celular. Las placas se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Al siguiente día,

5 una dilución serial del compuesto de prueba se preparó diluyendo el compuesto 1:3 en DMSO por 10 puntos. La placa DMSO es 1000X la concentración final. Además del inhibidor de CDK7, una columna sola de DMSO se incluyó como un control de crecimiento máximo y se incluyó una columna final de

10 estaurosporina a 10 μ M como un control de inhibición de crecimiento máximo. Una placa de dilución 10X entonces se preparó agregando 2 μ L por cavidad a partir de la placa de DMSO 1000X a 198 μ L por cavidad de OMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA, cat#31985-070). Las células se trataron con el

15 compuesto indicado agregando 11 μ L por cavidad a partir de la placa OMEM 10X a la placa celular que contiene 100 μ L de medio de crecimiento por cavidad para una concentración final 1X. Las placas se colocaron nuevamente en la incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Siete días después de la adición del

20 compuesto, las placas se removieron de la incubadora y se dejaron equilibrar a RT. El reactivo CELL TITER GLO® se descongeló a temperatura ambiente y después se preparó mezclando un vial de amortiguador de ensayo con un vial de sustrato y se agitó suavemente para mezclar. Se agregó

25 entonces reactivo CELL TITER GLO® a la placa celular, 100 μ L

por cavidad, y se colocó en un Sacudidor de Placa Tituladora a velocidad de ajuste 2 por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación de 15 minutos en un sacudidor, se leyó la luminiscencia, 1 segundo por cavidad, usando un Wallac VICTOR2™. Regresión no lineal y curvas sigmoidales de respuesta de dosis se usaron para calcular la concentración inhibidora máxima media (IC₅₀) con software Graphpad Prism 6.

Tabla 2

	Línea celular	Histología	IC ₅₀ (μM)	Número de catálogo	Información del medio
10	HCT116	Cáncer colorrectal	0.04601	ATCC# CCL-247	McCoy's 5A (Gibco 16600) + 10% de FBS (Hyclone SH30071.03)
	MCF7	Cáncer de mama	0.03201	ATCC# HTB-22	RPMI 1640 con L-Glutamina (Gibco 11875)+ 10% de FBS (Hyclone SH30071.03)
15	HCC1806	Cáncer de mama	0.02553	ATCC# CRL-2335	RPMI 1640 con HEPES & L-Glutamina (Gibco 22400)+ 10% de FBS (Gibco cat#10082)
20	NCI-H460	Cáncer de pulmón	0.0479	ATCC# HTB-177	RPMI 1640 con HEPES & L-Glutamina (Gibco 22400)+ 10% de FBS (Gibco cat#10082)
25	NCI-H446	Cáncer de pulmón	0.01419	ATCC# HTB-171	RPMI 1640 con HEPES & L-Glutamina (Gibco 22400)+ 1mM de Piruvato de Sodio (Gibco 11360) + 10% de FBS (Hyclone SH30071.03)

Línea celular	Histología	IC ₅₀ (μM)	Número de catálogo	Información del medio
A2780	Cáncer de ovario	0.02651	ATCC# CRL-2772	RPMI 1640 con L-Glutamina (Gibco 11875)+ 10% de FBS (Hyclone SH30071.03)
SNU-16	Cáncer gástrico	0.02312	ATCC# CRL-5974	RPMI 1640 con HEPES & L-Glutamina (Gibco 22400)+ 1mM de Piruvato de Sodio (Gibco 11360) + 10% de FBS (Hyclone SH30071.03)

10

Estos datos muestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe el crecimiento *in vitro* de líneas de células de cáncer a partir de una variedad de histologías que incluyen colon, mama, pulmón, ovario y estómago, en una manera dependiente de la dosis.

15

Modelo de Tumor de Injerto heterólogo

20

El propósito de este ensayo es medir la reducción en volumen del tumor en respuesta al compuesto del Ejemplo 1. Para evaluar la eficacia de un compuesto de prueba, se utilizaron modelos de tumor de injerto heterólogo múltiple. Brevemente, $5-10 \times 10^6$ células tumorales en una mezcla 1:1 MATRIGEL® (0.2 mL de volumen total), son inyectadas subcutáneamente en los ratones sin pelo atímicos hembra (Envigo, Harlan laboratories) para una mayoría de modelos de tumor de injerto heterólogo. Se utilizaron cepas de ratón

25

alterna para establecer injerto heterólogos MDAMB468 (NOD SCID Gamma, Jackson labs), CT26 y EMT6 (BALB/c, Envigo, Harlan Laboratories). Después de dejar a los tumores alcanzar un tamaño deseado de $\sim 300\text{--}500\text{ mm}^3$, los animales son
5 aleatorizados en grupos de 6-8 para estudios de eficacia. El compuesto de prueba se administró mediante alimentación forzada oral (PO) a dosis y regímenes indicados. El peso corporal y crecimiento del tumor son monitoreados con el tiempo para evaluar la eficacia y signos de toxicidad.

10 El compuesto de prueba se formuló en 5% de N-metil-2-pirrolidona (NMP) en 1% de hidroxietilcelulosa, 0.25% de polisorbato 80, 0.05% de antiespuma en agua purificada (HEC) y se administró por alimentación forzada oral (volumen final 0.2 mL) a las dosis indicadas en la Tabla 4. Un compuesto de
15 prueba se formuló en una base semanalmente y se almacenó a 4 °C. Los vehículos son administrados a los grupos de control de conformidad con los esquemas usados anteriormente usando un volumen de 0.2 mL por dosis. Los ratones son dosificados mediante alimentación forzada oral y las muestras de tumor
20 son recolectadas a terminación y almacenadas a -80 °C.

Los tamaños del tumor y peso corporal son registrados y analizados cada dos semanas. La sangre se recolectó usando tarjetas DBS (mancha de sangre seca) 2 horas después de la dosis y a terminación. Los tumores se
25 recolectaron en la terminación del estudio, se cortaron en 3

secciones y ya sea se congelaron a presión para exposición y análisis de proteína, o se colocaron en RNAlater® para análisis de ARN. Las muestras de tejido son congeladas y almacenadas a -80 °C.

5 El compuesto del Ejemplo 1 demostró significativa actividad anti-tumoral en modelos de injerto heterólogo de cáncer humano (Tabla 3).

Tabla 3: Sumario de eficacia del agente único *in vivo* del Ejemplo 1 ($\Delta T/C$) a través de una variedad de modelos de tumor de injerto heterólogo probados a diferentes niveles de dosis como se indica.

Modelo	Histología	Mutaciones	Dosis del Ejemplo 1 (mg/kg)	Esquema	Prom. $\Delta T/C$
A2780	Ovario	ARID1A	20	QDx35	-41
COLO205	Ovario		20	QDx28	-4
CT26	Colorrectal		20	QDx24	52
EMT6	Mama		20	QDx28	17
H441	Pulmón		20	QDx35	0
H460	Pulmón	ARID1A	20	QDx35	16
HCC1806	Mama	KMT2C	20	QDx28	-87
HCT116	Colorrectal	KMT2C	25	QDx21	-17
MDAMB468	Mama	ARID1A, RB1	20	QDx28	-91
MIAPACA2	Pancreático	ARID1A	20	QDx35	10
MKN45	Estómago	KMT2C	20	QDx35	57
MDAMB231	Mama		20	QDx35	-25

Se calculó el Delta T/C% cuando el volumen del tumor de punto final en un grupo tratado está en, o arriba del valor de referencia del volumen del tumor. La fórmula es $100 \cdot (T - T_0) / (C - C_0)$. Aquí, T y C son los volúmenes de tumor de punto final medio en el grupo tratado o de control, respectivamente. T₀ y C₀ son los volúmenes de tumor del valor de referencia medio en estos grupos. *: Significante (p<0.05)

Estudio Biomarcador

El propósito de este estudio es evaluar los biomarcadores predictivos potenciales para los compuestos de la presente invención.

Líneas de células de cáncer son perfiladas para evaluar la actividad anti-proliferativa de un compuesto de prueba *in vitro*. La mutación, número de copia e información de expresión del gen de los genes *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* y/o *RB1* a través de las líneas de células cancerosas se obtiene a partir de la base de datos COSMIC (cancer.sanger.ac.uk) y cBioportal (<http://www.cbioportal.org/>). Las células son cultivadas en medio de crecimiento y plaqueadas en una placa de 96 cavidades en 100 µL/cavidad de medio de crecimiento a 5000 células/cavidad, después incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ durante la noche. Las células son cultivadas usando medio y condiciones recomendadas por el proveedor bien conocidas en el arte, por ejemplo, con RPMI 1640 con o sin HEPES & L-Glutamina (Thermo SH30255.01) y 1mM de Piruvato de Sodio, y

10% de FBS (Gibco cat#10082). La placa de dilución 1000X del
intermediario se preparó elaborando una solución de trabajo
de 10 mM de una muestra de prueba en DMSO y realizando
diluciones 1:3 en DMSO por 10 puntos. La placa de
5 dosificación 10X se preparó agregando 2 μ L de la placa de
dilución 1000X del intermediario a 198 μ L de OPTIMEM® + 10%
de FBS y se mezcló bien. La placa celular entonces se trató
agregando 11 μ L de la placa de dosificación 10X en la placa
celular de 100 μ L/cavidad para una concentración final 1X. Se
10 usó estaurosorposrina como un control de inhibición de
crecimiento máximo a una concentración final de 5 μ M. La
placa celular se incubó por 7 días a 37 °C, 5% de CO₂. Siete
días después del tratamiento, el amortiguador de ensayo
celular Titer-Glo® (Promega cat# G7571) y sustrato se
15 removieron de -20 °C y se dejaron equilibrar a RT. El
amortiguador de ensayo se agregó al sustrato y se sacudió
suavemente para mezclarlo. El reactivo CELL TITER-GLO® (100
 μ L/cavidad) se agregó a la placa celular e incubó a RT por 15
minutos. Después de 15 minutos, la luminiscencia se leyó
20 usando un lector de placa. Los datos se analizaron en Excel y
se graficaron en GraphPad Prism. El análisis estadístico y
valor p se calculó usando pruebas t no paramétricas Mann-
Whitney usando GraphPad Prism.

Un sumario de datos de proliferación se muestra en
25 la Tabla 4. Los efectos anti-proliferativas de un compuesto

de prueba son categorizados como insensibles ($IC_{50} \geq 1 \mu M$), citostático ($IC_{50} < 1 \mu M$ y % de inhibición $< 70\%$) o citotóxico ($IC_{50} < 1 \mu M$ y % de inhibición $\geq 70\%$). Las líneas de células que llevan la inactivación o pérdida de mutaciones de función (LOF) en ya sea el gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* o *RB1* demostró
 5 respuesta citotóxica significativamente mayor al Ejemplo 1 comparado con el resto de las líneas de células en el panel (Tabla 5). Por el contrario, las líneas de células no LOF demostraron un (%) superior de respuesta citostática en
 10 respuesta al Ejemplo 1.

Además, un número de modelos de tumor de injerto heterólogo que llevan estas mutaciones se utilizaron para evaluar la eficacia del Ejemplo 1 como una monoterapia (Tabla 3).

15 Un resumen de estudios de eficacia y actividad anti-tumoral ($\Delta T/C$) se muestra en la Tabla 3. El Ejemplo 2 demuestra fuerte eficacia en una variedad de modelos de tumor, con regresiones significantes indicadas en los modelos de tumor que albergan mutaciones en genes *ARID1A*, *KMT2C* o
 20 *RB1*. Tomados en conjunto, estos hallazgos muestran que las mutaciones de inactivación en el gen *ARID1A*, *KMT2C*, *KMT2D* o *RB1* presentan una estrategia de selección de paciente potencial para el tratamiento con el Ejemplo 1 a través de múltiples tipos de cáncer.

25 Tabla 4: Resumen de log-GI50 anti-proliferativo

(nM) del Ejemplo 1 y (%) del Crecimiento de Inhibición a través de una variedad de líneas de células de cáncer como se indica. Las líneas celulares se trataron por 7 días y se analizaron usando ensayo CellTiter-Glo®.

Línea celular	Información del medio	histología	Efecto anti-proliferación			Mutaciones LOF en Gen(s)			
			IC ₅₀ (μM)	% de Inh.	resultado	ARID1A	KMT2C	KMT2D	RBI
22RV1	A	PRÓSTATA	0.028	77	Citotóxico	Sí			
A2058	B	PIEL	0.030	97	Citotóxico				Sí
A2780	C	OVARIO	0.052	74	Citotóxico	Sí			
A375	B	PIEL	0.055	86	Citotóxico				
A549	D	PULMÓN	0.139	64	Citostático				
A673	B	HUESO	0.014	96	Citotóxico				
AN3CA	E	ENDOMETRIO	0.050	67	Citostático	Sí			
AZ521	F	ESTÓMAGO	0.036	76	Citotóxico				
BT20	B	MAMA	0.373	45	Citostático				
C33A	F	ENDOMETRIO	0.014	79	Citotóxico	Sí		Sí	
CACO2	B	INTESTINO	0.189	60	Citostático				
CAOV3	B	OVARIO	0.019	96	Citotóxico		Sí		Sí
CCRFCE M	C	SANGRE	0.040	96	Citotóxico				
COLO201	C	INTESTINO	0.123	61	Citostático				
COLO320	C + 0.8 ug/mL de puromicina	INTESTINO	0.189	73	Citotóxico				
CORL311	C	PULMÓN	0.095	75	Citotóxico				
CORL88	C	PULMÓN	4.200	34	Insensible				Sí

25

5	HEC1A	J	ENDOMETRIO	0.162	56	Citostático	Sí	Sí		
	HEP3B217	F	HÍGADO	0.033	66	Citostático				Sí
	HEPG2	F	HÍGADO	0.028	78	Citotóxico				
	HEYA8	C	OVARIO	0.112	89	Citotóxico	Sí	Sí	Sí	
	HGC27	F	ESTÓMAGO	0.068	78	Citotóxico				
	HL60	C	SANGRE	0.045	87	Citotóxico				
	HLE	B	HÍGADO	0.030	77	Citotóxico		Sí		Sí
	HLF	B	HÍGADO	0.017	100	Citotóxico		Sí		Sí
	HOS	C	HUESO	0.090	72	Citotóxico		Sí		
10	HS294T	K	PIEL	0.020	84	Citotóxico				
	HS766T	L	PÁNCREAS	0.062	72	Citotóxico	Sí			
	HT	C	SANGRE	0.131	64	Citostático				
	HT1197	E	URINARIO	0.281	55	Citostático	Sí		Sí	
	HUH1	M	HÍGADO	0.128	72	Citotóxico	Sí			
	HUH28	A	BILIAR	2.896	32	Insensible	Sí			Sí
	HUH7	N	HÍGADO	0.175	64	Citostático				
	IGROV1	C	OVARIO	0.072	70	Citotóxico	Sí	Sí		
	IMR32	O	SNC	0.002	100	Citotóxico	Sí			
15	JHH4	B	HÍGADO	0.166	65	Citostático				
	JHH7	C	HÍGADO	0.027	88	Citotóxico				
	JURKAT	P	SANGRE	0.061	98	Citotóxico	Sí	Sí		
	K562	C	SANGRE	>10	-191	Insensible				
	Karpas1106	C	SANGRE	0.026	98	Citotóxico				
	KARPAS299	C	SANGRE	0.069	78	Citotóxico				
	KE97	C	SANGRE	0.158	58	Citostático				
	KELLY	C	SNC	0.058	80	Citotóxico				
	KLE	Q	ENDOMETRIO	0.028	65	Citostático		Sí		Sí
25	KP4	L	PÁNCREAS	0.036	65	Citostático				
	KPL1	G + 2	MAMA	0.668	43	Citostático				

5
10
15
20
25

5	NCIH1092	C	PULMÓN	0.683	42	Citostático				
	NCIH1155	B	PULMÓN	0.043	51	Citostático				Sí
	NCIH1299	A	PULMÓN	0.195	44	Citostático				
	NCIH1436	C	PULMÓN	0.195	56	Citostático	Sí			
	NCIH146	C + 0.8 ug/mL de puromicina	PULMÓN	0.030	77	Citotóxico				Sí
10	NCIH1666	C	PULMÓN	0.161	59	Citostático				
	NCIH1703	C	PULMÓN	0.040	92	Citotóxico				
	NCIH1734	C	PULMÓN	0.024	76	Citotóxico				Sí
	NCIH1975	C	PULMÓN	0.021	90	Citotóxico				Sí
	NCIH2030	X	PULMÓN	5.374	9	Insensible				
15	NCIH2081	W	PULMÓN	0.442	44	Citostático			Sí	Sí
	NCIH209	C + 0.8 ug/mL de puromicina	PULMÓN	0.040	83	Citotóxico				
	NCIH2122	C	PULMÓN	0.078	85	Citotóxico				
	NCIH2196	C	PULMÓN	0.123	63	Citostático				Sí
	NCIH2228	C	PULMÓN	0.276	57	Citostático				Sí
20	NCIH226	C	PULMÓN	1.197	43	Insensible				
	NCIH2347	C + 0.8 ug/mL de puromicina	PULMÓN	0.661	45	Citostático				
	NCIH358	C	PULMÓN	0.042	93	Citotóxico				
	NCIH441	C	PULMÓN	0.014	84	Citotóxico				
	NCIH446	C	PULMÓN	0.013	95	Citotóxico			Sí	Sí
25	NCIH460	C	PULMÓN	0.047	97	Citotóxico	Sí			
	NCIH520	C	PULMÓN	0.082	77	Citotóxico				
	NCIH522	C	PULMÓN	0.107	50	Citostático				
	NCIH524	C	PULMÓN	0.037	92	Citotóxico				Sí
	NCIH526	C	PULMÓN	0.018	94	Citotóxico				
	NCIH596	C	PULMÓN	0.922	46	Citostático				Sí

5	NCIH69	C	PULMÓN	0.173	68	Citostático				Sí
	NCIH727	C	PULMÓN	0.117	56	Citostático				
	NCIH82	C	PULMÓN	0.699	22	Citostático				Sí
	NIHOVCAR3	Y	OVARIO	0.040	96	Citotóxico				
	NUGC3	C	ESTÓMAGO	0.030	81	Citotóxico	Sí	Sí	Sí	
10	NUGC4	C	ESTÓMAGO	0.019	83	Citotóxico				
	OAW42	Z	OVARIO	0.136	88	Citotóxico	Sí			
	OCUM1	N	ESTÓMAGO	0.027	82	Citotóxico	Sí			
	OV90	C	OVARIO	0.034	61	Citostático				
	OVCAR5	Y	OVARIO	0.086	74	Citotóxico				
15	OVCAR8	C	OVARIO	0.065	90	Citotóxico				Sí
	OZ	AA	HÍGADO	0.050	77	Citotóxico				
	PANC1	L	PÁNCREAS	0.071	47	Citostático				
	PATU8988T	C	PÁNCREAS	0.201	55	Citostático				
	PLCPRF5	BB	HÍGADO	>10	41	Insensible				
20	Raw264.7	C		0.355	62	Citostático				
	RKO	B	INTESTINO	0.118	61	Citostático	Sí			
	RT112	P	URINARIO	0.032	87	Citotóxico				
	SAOS2	CC	HUESO	0.028	66	Citostático				Sí
	SH10TC	C	ESTÓMAGO	0.147	58	Citostático				Sí
25	SHSY5Y	DD	SNC	0.059	95	Citotóxico				
	SiHa	F	ENDOMETRIO	0.105	58	Citostático				
	SJRH30	C	TEJIDO BLANDO	0.039	62	Citostático				
	SKHEP1	BB	HÍGADO	0.118	71	Citotóxico				
	SKMEL28	B	PIEL	0.098	61	Citostático				
	SKMES1	F	PULMÓN	0.028	80	Citotóxico			Sí	
	SKOV3	J	OVARIO	>10	27	Insensible	Sí			
	SKUT1	E	TEJIDO BLANDO	0.041	89	Citotóxico	Sí			Sí
	SNU1	C	ESTÓMAGO	0.105	68	Citostático	Sí	Sí		

5
10
15
20
25

U87MG	O	SNC	7.356	-5	Insensible				
UACC812	U	MAMA	0.076	58	Citostático	Si			
UACC893	U	MAMA	4.150	-51	Insensible				Si
UMUC3	E	URINARIO	0.161	70	Citotóxico				
ZR751	C	MAMA	0.043	69	Citostático				

5

Información del Medio:

A. RPMI 1640 (Gibco 11835, Gibco 22400-089, o Hyclone Cat # SH30027) + 10% de FBS (Gibco cat#10082)

10 B. DMEM con L-Glutamina (Thermo cat#SH30022) + NaPir + NEAA + HEPES + 10% de FBS (Gibco cat#10082)

C. RPMI 1640 con HEPES & L-Glutamina (Gibco 22400) + 1mM de Piruvato de Na + 10% de FBS (Gibco cat#10082)

D. Medio F-12K (Cat#30-2004)+ 10% de FBS (Gibco cat#10082)

15 E. EMEM (CellGro cat#17-305-CV) + L-Glutamina + Piruvato de Na + Bicarbonato de Na + 10% de FBS (Gibco cat#10082)

20 F. EMEM (CellGro cat#17-305-CV) + L-Glutamina + Piruvato de Na + Bicarbonato de Na + NEAA+ 10% de FBS (Gibco cat#10082)

G. DMEM (Gibco 11995) + 1mM de Piruvato de Na + 10% de FBS (Gibco cat#10082)

25 H. DMEM de Alta Glucosa (Hyclone Cat # SH30022) + 10 % de HI FBS (Gibco Cat # 10082) + 1X NEAA (Hyclone SH30328)

- I. RPMI 1640 modificado con ATCC (Gibco A1049101)
+ 1mM de Piruvato de Na + 10% de FBS (Gibco cat#10082)
- J. McCoy's 5A + 10% de FBS (Gibco cat#10082)
- K. DMEM (Gibco 11965) + 10% de FBS
- 5 L. MEM Eagle con Sales de Earle (Gibco 11095-080)
+ 1% de NEAA + 1% de NaPir + 10% de FBS (Gibco cat#10082)
- M. RPMI-1640 con L-glutamina y HEPES + 10% de FBS
inactivado con calor
- N. DMEM con L-Glutamina (Thermo cat#SH30022) +
10 Piruvato de Na + 10% de FBS (Gibco cat#10082)
- O. MEM (Gibco 11095) + Piruvato de Na + NEAA +
10% de FBS (Gibco cat#10082)
- P. RPMI 1640 con HEPES & L-Glutamina (Thermo
SH30255.01 o Gibco 11835) + 1mM de Piruvato de Sodio + 10% de
15 FBS (Gibco cat#10082)
- Q. DMEM:F12 p/ 2.5 mM de L-glutamina, 15 mM de
HEPES + 0.5 mM de Piruvato de Na + 10% de FBS
- R. 49% de RPMI 1640 + 49% de F12 de Ham + 2% de
h.i. FBS
- 20 S. 45% de RPMI 1640 + 45% de F12 de Ham + 10% de
h.i. FBS
- T. DMEM (Gibco 11965) + 1mM de Piruvato de Na +
5% de FBS (Gibco cat#10082)
- U. L15 de Leibovitz (Gibco cat#11415-064) + 10%
25 de FBS (Gibco cat#10082), No CO₂

V. DMEM con Glu y L-gln alto + 10% de FBS
inactivado con calor + NaPir + NEAA + HEPES

W. DMEM:F12 (1:1) + ITS + 10nM de Hidrocortisona
+ 10nM de beta-Estradiol + 4.5mM de L-glut + 5% de FBS (Gibco
5 cat#10082)

X. RPMI-1640 con L-glutamina y HEPES + 10% de FBS

Y. RPMI 1640 con HEPES y L-Glutamina (Gibco
22400) + 1mM de Piruvato de Na + NEAA + 20% de FBS (Gibco
cat#10082)

10 Z. DMEM + 2mM de Glutamina + 1mM de Piruvato de
Sodio (NaP) + 20 IU/l de Insulina Bovina + 10% de FBS (Gibco
cat#10082)

AA. Medio E de Williams (Gibco Cat # 12551) + 10%
de FBS

15 BB. MEM + 10% de FBS + NaPir + NEAA + HEPES +
1.5g/L NaHCO₃

CC. 5A de McCoy (Gibco 16600) + 15% de FBS (Gibco
cat#10082)

20 DD. 1:1 MEM (11095): F12 (CellGro 10-080-CV) + 10%
de FBS (Gibco cat#10082)

EE. RPMI-1640 con glutamina y HEPES (Hyclone Cat #
SH30255) + 10% de FBS (Gibco Cat # 16000) + 1X NaPir

FF. Medio de Dulbecco modificado por Iscove p/L-
glutamina, 25mM de HEPES [GIBCO 12440-053]+20% de FBS

25 GG. RPMI 1640 con HEPES y L-Glutamina (libre de

fenol rojo) + 1mM de Piruvato de Na + 10% de FBS (Gibco cat#10082)

HH. 1:1 Hams F12: DMEM + L-Glutamina + 5% de FBS (Gibco cat#10082)

5 II. RPMI-1640 (Hyclone Cat # SH30027) + 10% de FBS inactivado por calor (Gibco Cat # 10082)

JJ. 1:1 de mezcla de medio MCDB 105 que contiene una concentración final de 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y Medio 199 que contiene una concentración final de 2.2 g/L de
10 bicarbonato de sodio + 15% de FBS

Tabla 5: Distribución (%) de efectos anti-proliferativos del Ejemplo 1 a través de las líneas de células de cáncer que llevan mutaciones LOF.

15		Citotóxico (IC ₅₀ <1μM, % de Inh. ≥70)	Citostático (IC ₅₀ <1μM, % de Inh. <70)	Insensible (IC ₅₀ ≥1μM, % de Inh. <70)
	Mutantes ARID1A	64%, n=25	23%, n=9	13%, n=5
	Mutantes KMT2D	76%, n=19	12%, n=3	12%, n=3
	Mutante KMT2C	70%, n=7	20%, n=2	10%, n=1
20	Mutantes RB1	54%, n=22	37%, n=15	10%, n=4
	Otros	40%, n=41	44%, n=45	17%, n=17