

FORMULACIONES DE UN INHIBIDOR DE AXL/MER

CAMPO

- 5 La presente solicitud se relaciona con formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación sólidas de un inhibidor de AXL/MER, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, que incluye métodos de preparación de estas, que son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por AXL/MER tales como cáncer.

10

ANTECEDENTES

- Los receptores de tirosina cinasas (RTK, por sus siglas en inglés) son proteínas de la superficie celular que transmiten señales del entorno extracelular al citoplasma y el núcleo de la célula para regular los eventos celulares tales como supervivencia, crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y migración.

- La subfamilia TAM consiste en tres RTK que incluyen Tyro3, AXL y MER (Graham et ál., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et ál., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83). Las TAM cinasas se caracterizan por un dominio de unión al ligando extracelular que consiste en dos dominios tipo inmunoglobulina y dos dominios de fibronectina tipo III. Se han identificado dos ligandos, gen 6 específico para la detención del crecimiento (GAS6) y proteína S (PROS1), para cinasas TAM. GAS6 se puede unir a y activar las tres cinasas TAM, al tiempo que PROS1 es un ligando para Mer y Tyro3 (Graham et ál., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785).

- AXL (también conocido como UFO, ARK, JTK11 y TYRO7) se identificó originalmente como un gen transformador a partir de ADN de pacientes con leucemia mielógena crónica (O'Bryan et ál., 1991, Mol Cell Biol 11, 5016-5031; Graham et ál., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et ál., 2008,

Advances in Cancer Research 100, 35-83). El GAS6 se une a AXL e induce la posterior autofosforilación y activación de tirosina cinasa AXL. AXL activa varias vías de señalización posterior que incluyen PI3K-Akt, Raf-MAPK, PLC-PKC (Feneyrolles et ál., 2014, Molecular Cancer Therapeutics 13, 2141-2148; Linger et ál., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83).

MER (también conocido como MERTK, EYK, RYK, RP38, NYK y TYRO12) se identificó originalmente como una fosfoproteína de una biblioteca de expresión de linfoblastoides (Graham et ál., 1995, Oncogene 10, 2349-2359; Graham et ál., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et ál., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83). Tanto GAS6 como PROS1 se pueden unir a Mer e inducir la fosforilación y la activación de cinasa Mer (Lew et ál., 2014). Al igual que AXL, la activación de MER también implica vías de señalización posterior que incluyen PI3K-Akt y Raf-MAPK (Linger et ál., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83).

TYRO3 (también conocido como DTK, SKY, RSE, BRT, TIF, ETK2) se identificó originalmente a través de un estudio de clonación basado en PCR (Lai et ál., Neuron 6, 691-70, 1991; Graham et ál., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et ál., 2008, Advances in Cancer Research 100, 3583). Ambos ligandos, GAS6 y PROS1, se pueden unir a TYRO3 y activarlo. Aunque las vías de señalización corriente abajo de la activación de TYRO3 son las menos estudiadas entre las RTK de TAM, parece que tanto las vías de PI3K-Akt como de Raf-MAPK están involucradas (Linger et ál., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83). Se observa que AXL, MER y TYRO3 se sobreexpresan en células cancerosas.

Por consiguiente, son necesarios compuestos y métodos de uso de estos para la modulación de cinasas AXL/MER en el tratamiento del cáncer.

COMPENDIO

La presente invención se dirige a, entre otros, una formulación farmacéutica que comprende N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (Compuesto I) o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, un ácido orgánico y un tensioactivo.

La presente invención se dirige adicionalmente a una forma de dosificación que comprende una formulación farmacéutica proporcionada en la presente.

La presente invención se dirige adicionalmente a un método para tratar una enfermedad relacionada con la actividad de AXL/MER que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica o una forma de dosificación proporcionada en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un patrón de XRPD representativo de la sal de ácido maleico del Compuesto I.

La Figura 2 muestra un termograma de DSC representativo de la sal de ácido maleico del Compuesto I.

La Figura 3 muestra datos de TGA representativos de la sal de ácido maleico del Compuesto I.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se relaciona con composiciones farmacéuticas (o

formulaciones) y formas de dosificación del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, una sal de ácido maleico del Compuesto 1), hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable de este, que tiene propiedades mejoradas tales como la biodisponibilidad. En particular, las formulaciones y formas de dosificación de la presente invención ayudan a aumentar la biodisponibilidad del Compuesto I (por ejemplo, maleato del Compuesto I). La inclusión de un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, y un tensioactivo tal como poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) puede proporcionar un aumento en la biodisponibilidad.

10 *Formulaciones*

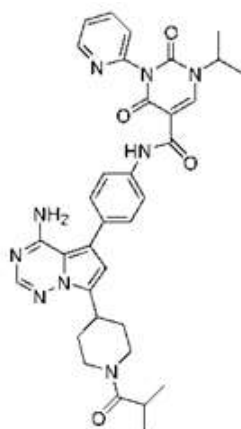
La presente invención proporciona, entre otros, una formulación farmacéutica en una forma de dosificación oral sólida que comprende:

15 (a) N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (Compuesto I), o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto 1), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

20 (b) un ácido orgánico; y

(c) un tensioactivo.

El Compuesto I es un inhibidor de AXL/MER y se designa como N-(4-(4-amino-7-(1- isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida que tiene la fórmula:



Compuesto I

La sal de ácido maleico del Compuesto I hace referencia a maleato de N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida, que también se designa como "ácido maleico del Compuesto I" o "maleato del Compuesto I". La presente descripción también incluye otras sales del Compuesto I. Los ejemplos de dichas sales incluyen, por ejemplo, sal de ácido sulfúrico (por ejemplo, sal de ácido hemisulfúrico), sal de ácido fosfórico, sal de ácido clorhídrico, sal de ácido salicílico, sal de ácido metanosulfónico (es decir, sal de mesilato), sal de ácido etanosulfónico (es decir, sal de esilato), sal de ácido bencenosulfónico (es decir, sal de besilato) y sal de ácido p-toluenosulfónico (por ejemplo, sal de tosilato).

El Compuesto I puede prepararse de acuerdo con los procedimientos en la patente estadounidense n.º 9,981,975. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 83. La sal de ácido maleico del Compuesto I y diversas formas cristalinas pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos en la solicitud provisional estadounidense 62/564,070. Ver también por ejemplo los ejemplos proporcionados en la presente.

En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, utilizado en la presente se encuentra en forma cristalina. En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, utilizado en la presente no se

encuentra en forma cristalina. En otras modalidades, el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, utilizado en la presente es un hidrato. En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, utilizado en la presente es un solvato. En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, utilizado en la presente es anhidro.

En algunas modalidades, el maleato del Compuesto I utilizado en la presente en forma cristalina. En algunas modalidades, el maleato del Compuesto I utilizado en la presente no se encuentra en forma cristalina. En otras modalidades, el maleato del Compuesto I utilizado en la presente es un hidrato. En algunas modalidades, el maleato del Compuesto I utilizado en la presente es un solvato. En algunas modalidades, el maleato del Compuesto I utilizado en la presente es anhidro.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende:

(a) el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este,

(b) un ácido orgánico; y

(c) un tensioactivo.

En determinadas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en la presente incluye adicionalmente un diluyente. En determinadas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en la presente incluye adicionalmente un lubricante. En determinadas modalidades, la formulación farmacéutica proporcionada en la presente incluye adicionalmente un desintegrante.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 1 %

en peso a alrededor de 20 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

- 5 En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso a alrededor de 12 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 5 % en peso a alrededor de 10 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.
- 10 En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso a alrededor de 8 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 2 % en peso a alrededor de 6 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. En
- 15 algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso, alrededor de 4 % en peso, alrededor de 5 % en peso, alrededor de 6 % en peso, alrededor de 7 % en peso, alrededor de 8 % en peso, alrededor de 9 % en peso, alrededor de 10 % en peso, alrededor de 11 % en peso o alrededor de 12 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable
- 20 de este. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 12 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.
- 25 En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 1 % en peso a alrededor de 20 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso a alrededor de
- 30 12 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 5 % en peso a alrededor de 10 % en peso de

maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso a alrededor de 8 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 2 % en peso a alrededor de 6 % en peso de maleato del Compuesto I.

- 5 En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso, alrededor de 4 % en peso, alrededor de 5 % en peso, alrededor de 6 % en peso, alrededor de 7 % en peso, alrededor de 8 % en peso, alrededor de 9 % en peso, alrededor de 10 % en peso, alrededor de 11 % en peso o alrededor de 12 % en peso del maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación
- 10 farmacéutica comprende alrededor de 3 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 4 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 7 % en peso de maleato del Compuesto I. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende alrededor de 12 %
- 15 en peso de maleato del Compuesto I.

El porcentaje en peso y cantidad del Compuesto I descrito en la presente se calculan en función de la base libre del Compuesto I a menos que se especifique lo contrario.

- 20 El tensioactivo presente en determinadas formulaciones de la invención ayuda a aumentar la biodisponibilidad del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. El término "tensioactivo" hace referencia a compuestos que reducen la tensión superficial entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. En algunas modalidades, los
- 25 tensioactivos también pueden tener otras funciones tales como detergentes, agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes y dispersantes. Los tensioactivos de ejemplo incluyen, de forma no taxativa, poloxámeros. Los ejemplos de poloxámeros son poloxámero 407, poloxámero 338, poloxámero 237 y poloxámero 188. En una modalidad, el poloxámero es poloxámero 188. En una
- 30 modalidad, el poloxámero es poloxámero 407. El poloxámero es un copolímero de polietileno-propilén glicol (los nombres comerciales conocidos son Supronic,

Pluronic o Tetronic) que tiene una propiedad termorreversible y una propiedad de transición sol-gel que puede ayudar a la liberación del fármaco. Por ejemplo, el poloxámero se muestra en un estado sólido por debajo de la temperatura ambiente y pasa al estado en gel a temperatura corporal (37,2 °C), lo que puede modificar las características de liberación del fármaco (D. Ramya Devi et ál, J. Pharm. Sci. & Res. Vol.5(8), 2013, 159 - 165; Y. Mao et ál. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35 (2004) 1127-1142).

En algunas modalidades, el tensioactivo utilizado en las formulaciones es poloxámero 407. No se espera que el poloxámero 407 aumente la biodisponibilidad del maleato del Compuesto I dado que, entre otros, los estudios de solubilidad mostraron que el tensioactivo de lauril sulfato sódico (SLS) aumentó la solubilidad del maleato del Compuesto I en comparación con el poloxámero 407, pero la biodisponibilidad de una formulación que comprende SLS es inferior que la de una formulación que comprende un poloxámero. Ver ejemplos proporcionados en la presente.

El tensioactivo en la formulación puede ser de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 20 % en peso. El tensioactivo en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso. El tensioactivo en la formulación puede ser de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso. El tensioactivo en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso a alrededor de 10 % en peso. Por ejemplo, el tensioactivo en la formulación puede ser alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 15 o alrededor de 20 % en peso. En algunas modalidades, el tensioactivo en la formulación es alrededor de 5 % en peso. En algunas modalidades, el tensioactivo en la formulación es alrededor de 10 % en peso.

En algunas modalidades, el tensioactivo es poloxámero 407. El poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación puede ser de alrededor de 1 % en peso

a alrededor de 20 % en peso. El poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación puede ser de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso. El poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso. El poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso a alrededor de 10 % en peso. Por ejemplo, el poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación puede ser alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 15 o alrededor de 20 % en peso. En algunas modalidades, el poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación es alrededor de 5 % en peso. En algunas modalidades, el poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407) en la formulación es alrededor de 10 % en peso.

Las formulaciones de la invención incluyen un ácido orgánico, que puede aumentar la biodisponibilidad del Compuesto I. La expresión "ácido orgánico" hace referencia a un compuesto orgánico con propiedades ácidas. En algunas modalidades, el ácido orgánico es alquilo C₁₋₆, alqueno C₂₋₆ o un heterocicloalquilo de 5-6 miembros, cada uno sustituido con uno o más grupos ácidos (por ejemplo, 1, 2 o 3 grupos de ácido carboxílico, alcohol o ácido sulfónico), donde el heterocicloalquilo de 5-6 miembros se sustituye opcionalmente con un grupo alquilo C₁₋₆ que se sustituye opcionalmente con uno o más grupos ácidos (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 grupos de ácido carboxílico, alcohol o ácido sulfónico). El ácido orgánico puede ser un alquilo C₁₋₆ o alqueno C₂₋₆ sustituido con uno o más grupos ácidos (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 grupos de ácido carboxílico, alcohol o ácido sulfónico). En algunas modalidades, el ácido orgánico es un alquilo C₁₋₆ o alqueno C₂₋₆ sustituido con 1, 2 o 3 grupos de ácido carboxílico y se sustituyó con 0, 1 o 2 grupos alcohol. En algunas modalidades, el ácido orgánico es heterocicloalquilo de 5-6 miembros sustituido con uno o más grupos ácidos (por ejemplo, 1, 2 o 3 grupos de ácido carboxílico, alcohol o ácido sulfónico) y sustituido opcionalmente con un alquilo C₁₋₆, donde el alquilo C₁₋₆ se sustituye opcionalmente con uno o más grupos ácidos (por ejemplo, 1, 2 o 3 grupos de ácido carboxílico, alcohol o ácido sulfónico). Los ácidos orgánicos de

ejemplo incluyen, de forma no taxativa, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido fumárico, ácido málico, ácido sórbico, ácido tartárico e hidratos o solvatos de estos. El ácido orgánico en la formulación puede ser de alrededor de 1 % en peso y hasta alrededor de 50 % en peso. El ácido orgánico en la formulación puede ser de
5 alrededor de 5 % en peso hasta alrededor de 40 % en peso. El ácido orgánico en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso hasta alrededor de 30 % en peso. El ácido orgánico en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso hasta alrededor de 20 % en peso. El ácido orgánico en la formulación puede ser de alrededor de 10 % en peso hasta alrededor de 20 % en peso. Por ejemplo, el ácido
10 orgánico en la formulación puede ser alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % en peso. En algunas modalidades, el ácido orgánico en la formación es alrededor de 10 % en peso. En algunas modalidades, el ácido orgánico en la formación es alrededor de 20 % en peso.

15 En algunas modalidades, el ácido orgánico es ácido cítrico. En algunas modalidades, el ácido cítrico es monohidrato de ácido cítrico. El ácido cítrico en la formulación puede ser de alrededor de 1 % en peso y hasta alrededor de 50 % en peso. El ácido cítrico en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso hasta
20 alrededor de 40 % en peso. El ácido cítrico en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso hasta alrededor de 30 % en peso. El ácido cítrico en la formulación puede ser de alrededor de 5 % en peso hasta alrededor de 20 % en peso. El ácido cítrico en la formulación puede ser de alrededor de 10 % en peso hasta alrededor de 20 % en peso. Por ejemplo, el ácido cítrico en la formulación puede ser alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45 o 50 % en peso. En algunas
25 modalidades, el ácido cítrico en la formación es alrededor de 10 % en peso. En algunas modalidades, el ácido cítrico en la formación es alrededor de 20 % en peso.

Las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden incluir adicionalmente un diluyente. Tal como se usa en la presente, el término "diluyente"
30 hace referencia a un compuesto que puede diluir una composición. El diluyente también puede designarse como un relleno, diluyente o rebajador. Los diluyentes

de ejemplo incluyen, de forma no taxativa, lactosa, monohidrato de lactosa, monohidrato secado por aspersión, lactosa-316 Fast Flo®, manitol, celulosa microcristalina, celulosa ácida, almidón 1500, prosolve MCC y sílice coloidal. En determinados casos, el diluyente es manitol. El diluyente en la formulación puede ser de alrededor de 40 % en peso a alrededor de 90 % en peso. El diluyente en la formulación puede ser de alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso. El diluyente en la formulación puede ser de alrededor de 50 % en peso a alrededor de 75 % en peso. El diluyente en la formulación puede ser de alrededor de 70 % en peso a alrededor de 80 % en peso. El diluyente en la formulación puede ser de alrededor de 72 % en peso a alrededor de 77 % en peso. Por ejemplo, el diluyente en la formulación puede ser alrededor de 40, alrededor de 45, alrededor de 50, alrededor de 55, alrededor de 60, alrededor de 65, alrededor de 70, alrededor de 75, alrededor de 80, alrededor de 85 o alrededor de 90 % en peso. En algunas modalidades, el diluyente en la formulación es alrededor de 50 % en peso. En algunas modalidades, el diluyente en la formulación es alrededor de 75 % en peso. En algunas modalidades, el diluyente en la formulación es alrededor de 73 % en peso. En algunas modalidades, el diluyente en la formulación es alrededor de 76 % en peso.

En algunas modalidades, las formulaciones de la invención incluyen un desintegrante. Tal como se utiliza en la presente, el término "desintegrante" hace referencia a un compuesto que puede causar una formulación (por ejemplo, cápsulas o tabletas) para desintegrarse y liberar su sustancia de fármaco, por ejemplo, en contacto con la humedad. Los desintegrantes pueden facilitar, por ejemplo, una cápsula, para romperse luego de la administración oral. Los desintegrantes pueden estar presentes en una cantidad de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso. El desintegrante en la formulación puede ser alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso. El desintegrante en la formulación puede ser alrededor de 2 % en peso a alrededor de 3 % en peso. El desintegrante en la formulación puede ser alrededor de 2,5 % en peso. Los ejemplos no taxativos de desintegrantes incluyen croscarmelosa sódica, crospovidona,

almidón, celulosa e hidroxipropil celulosa de baja sustitución. En algunas modalidades, el desintegrante es crospovidona.

En algunas modalidades, las formulaciones de la invención incluyen un lubricante.

5 Tal como se utiliza en la presente, el término "lubricante" hace referencia a un compuesto, por ejemplo, un compuesto orgánico que puede reducir la fricción entre las sustancias en una formulación. Los lubricantes pueden estar en las formulaciones en una cantidad de alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso. En algunas modalidades, el lubricante está presente en una cantidad de
10 alrededor de 2 % en peso. Los ejemplos no taxativos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico (estearina), aceite hidrogenado, polietilenglicol, fumarato estearil de sodio y behenato de glicerilo. En algunas modalidades, el lubricante es fumarato estearil de sodio o ácido esteárico. En algunas modalidades, el lubricante es ácido esteárico.

15

En algunas modalidades, las formulaciones proporcionadas en la presente incluyen un deslizante. Tal como se utiliza en la presente, el término "deslizante" hace referencia a un compuesto que puede mejorar la capacidad de flujo de una mezcla, por ejemplo, una mezcla en polvo en una cápsula. Los deslizantes pueden estar en
20 las formulaciones en una cantidad de alrededor de 0,1 % en peso a alrededor de 5 % en peso. En algunas modalidades, el deslizante en la formulación es alrededor de 0,5 % en peso a alrededor de 1 % en peso. En algunas modalidades, el deslizante en la formulación es alrededor de 0,1 % en peso a alrededor de 1 % en peso. En algunas modalidades, el deslizante en la formulación es alrededor de 0,5
25 % en peso. Los ejemplos no taxativos de deslizantes incluyen talco, sílice coloidal (dióxido de silicio coloidal) y almidón de maíz. En algunas realizaciones, el deslizante es sílice coloidal.

En algunas modalidades, donde, por ejemplo, las formulaciones y formas de
30 dosificación de la invención se prevén para formas de dosificación de liberación sostenida, puede incluirse un formador de matriz de liberación sostenida. Los

ejemplos de formadores de matriz de liberación sostenida incluyen éteres
celulósicos tales como hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, hipromelosa) que es un
polímero de alta viscosidad. Las formas de dosificación de liberación sostenida de
la invención pueden incluir, por ejemplo, alrededor de 10 a alrededor de 30 %,
5 alrededor de 15 a alrededor de 25 % o alrededor de 18 a alrededor de 24 % en peso
de un formador de matriz de liberación sostenida.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación
farmacéutica que comprende:

10 (a) el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de
este;

(b) ácido cítrico; y

15 (c) un poloxámero.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación
farmacéutica que comprende:

20 (a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una
sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico; y

25 (c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso de un poloxámero.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación
farmacéutica que comprende:

30 (a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso de N-(4-(4-amino-7-(1-

isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (Compuesto I) o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

5 (b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso de un poloxámero.

10 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

15 (b) ácido cítrico;

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407); y

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol).

20

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

25 (a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

30 (c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso (por ejemplo, poloxámero 407); y

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por ejemplo, manitol).

5 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

10 (b) ácido cítrico;

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol); y

15

(e) un lubricante (por ejemplo, ácido esteárico).

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

20

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

25

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por ejemplo, manitol); y

30

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso (por ejemplo, ácido esteárico);

5 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) el Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

10 (b) ácido cítrico;

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol);

15

(e) un lubricante (por ejemplo, ácido esteárico); y

(f) un desintegrante (por ejemplo, crospovidona).

20 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

25

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso (por ejemplo, poloxámero 407);

30

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por

ejemplo, manitol);

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso (por ejemplo, ácido esteárico); y

5

(f) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso de desintegrante (por ejemplo, crospovidona).

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

10

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

15

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso de un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407);

20

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por ejemplo, manitol);

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso de lubricante (por ejemplo, ácido esteárico); y

25

(f) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso de desintegrante (por ejemplo, crospovidona).

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

30

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso de polómero 407;

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de manitol;

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso de ácido esteárico; y

(f) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso de N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (Compuesto I) o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 10 % en peso de polómero 407;

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de manitol;

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso de ácido esteárico; y

(f) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

- 5 (a) alrededor de 12 % del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;
- (b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico; y
- 10 (c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

- 15 (a) alrededor de 12 % del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este;
- (b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico;
- (c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407;
- 20 (d) alrededor de 50 % en peso de manitol;
- (e) alrededor de 2 % en peso de ácido esteárico; y
- 25 (f) alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

- 30 (a) alrededor de 3 % del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este:

(b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407.

5

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 3 % del Compuesto I, o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este:

10

(b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407;

15

(d) alrededor de 60 % en peso de manitol;

(e) alrededor de 2 % en peso de ácido esteárico; y

20

(f) alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

25

(a) maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

(b) ácido cítrico; y

(c) un poloxámero.

30

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación

farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

5

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso de un poloxámero.

10 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

15 (b) ácido cítrico;

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407); y

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol).

20

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del maleato del
25 Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso (por ejemplo, poloxámero
30 407); y

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por ejemplo, manitol).

5 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

10 (b) ácido cítrico;

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol); y

15 (e) un lubricante (por ejemplo, ácido esteárico).

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

20 (a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

(b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

25 (c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por ejemplo, manitol); y

30

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso (por ejemplo, ácido

esteárico);

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

5

(a) maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

(b) ácido cítrico;

10

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol);

(e) un lubricante (por ejemplo, ácido esteárico); y

15

(f) un desintegrante (por ejemplo, crospovidona).

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

20

(a) maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

(b) ácido cítrico;

25

(c) un poloxámero (por ejemplo, poloxámero 407);

(d) un diluyente (por ejemplo, manitol);

(e) un lubricante (por ejemplo, ácido estérico);

30

(f) un desintegrante (por ejemplo, crospovidona); y

(g) un deslizante (por ejemplo, sílice coloidal).

5 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

10 (b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso (por ejemplo, poloxámero 407);

15 (d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de diluyente (por ejemplo, manitol);

(e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso (por ejemplo, ácido esteárico); y

20

(f) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso de desintegrante (por ejemplo, crospovidona).

25 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 15 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

30 (b) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 30 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 5 % en peso a alrededor de 15 % en peso de polómero 407;

(d) alrededor de 50 % en peso a alrededor de 80 % en peso de manitol;

5 (e) alrededor de 1 % en peso a alrededor de 5 % en peso de ácido esteárico; y

(f) alrededor de 2 % en peso a alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

10 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 12 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

15 (b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407.

20 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 12 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

25 (b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407;

(d) alrededor de 50 % en peso de manitol;

30

(e) alrededor de 2 % en peso de ácido esteárico; y

(f) alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

5 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 3 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

10 (b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407.

15 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 4 % en peso del maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

20 (b) alrededor de 10 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 5 % en peso de poloxámero 407.

25 En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

(a) alrededor de 7 % en peso del maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

30 (b) alrededor de 10 % en peso de ácido cítrico; y

(c) alrededor de 5 % en peso de poloxámero 407.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

5

(a) alrededor de 3 % en peso del maleato del Compuesto I, o un solvato o hidrato de este;

(b) alrededor de 20 % en peso de ácido cítrico;

10

(c) alrededor de 10 % en peso de poloxámero 407;

(d) alrededor de 60 % en peso de manitol;

15

(e) alrededor de 2 % en peso de ácido esteárico; y

(f) alrededor de 5 % en peso de crospovidona.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

20

(a) alrededor de 4 % en peso del maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

25

(b) alrededor de 10 % en peso de ácido cítrico;

(c) alrededor de 5 % en peso de poloxámero 407;

(d) alrededor de 76 % en peso de manitol;

30

(e) alrededor de 2 % en peso de ácido esteárico;

(f) alrededor de 2,5 % en peso de crospovidona; y

(g) alrededor de 0,5 % en peso de sílice coloidal.

5

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una formulación farmacéutica que comprende:

10

(a) alrededor de 7 % en peso del maleato del Compuesto I o un solvato o hidrato de este;

(b) alrededor de 10 % en peso de ácido cítrico;

15

(c) alrededor de 5 % en peso de poloxámero 407;

(d) alrededor de 73 % en peso de manitol;

(e) alrededor de 2 % en peso de ácido esteárico;

20

(f) alrededor de 2,5 % en peso de crospovidona; y

(g) alrededor de 0,5 % en peso de sílice coloidal.

25

Las formulaciones farmacéuticas en formas de dosificación sólida proporcionadas en la presente que son adecuadas para la administración oral pueden prepararse mediante la mezcla del maleato del Compuesto I con un ácido orgánico, y un tensioactivo. La formulación farmacéutica formada puede ser preparada adicionalmente para formar una cápsula.

30

En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, se encuentra

en forma cristalina. La forma cristalina del maleato del Compuesto I se describe en la solicitud provisional estadounidense 62/564,070, que se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia. Ver también por ejemplo los ejemplos proporcionados en la presente.

5

En algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene al menos un pico de XRPD, en términos de 2-theta, que se selecciona de alrededor de 4,3°, alrededor de 8,4°, alrededor de 12,6°, alrededor de 13,2°, y alrededor de 18,5°. En

10

algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene al menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, que se seleccionan de alrededor de 4,3°, alrededor de 8,4°, alrededor de 12,6°, alrededor de 13,2°, y alrededor de 18,5°. En

15

algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene al menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, que se seleccionan de alrededor de 4,3°, alrededor de 8,4°, alrededor de 12,6°, alrededor de 13,2°, y alrededor de 18,5°. En

20

algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, que se seleccionan de alrededor de 4,3°, alrededor de 8,4°, alrededor de 12,6°, alrededor de 13,2°, y alrededor de 18,5°. En

algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I comprende los siguientes picos de XRPD, en términos de 2-theta: alrededor de 4,3°, alrededor de 8,4°, alrededor de 12,6°, alrededor de 13,2°, y alrededor de 18,5°. En algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I comprende los siguientes picos de XRPD, en términos de 2-theta: alrededor de 4,3°, alrededor de 8,4°, y alrededor de 13,2°.

25

En algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene un perfil de XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 1.

30

De la misma manera, las lecturas de temperatura vinculadas a DSC, TGA u otros experimentos térmicos pueden variar ± 3 °C dependiendo del instrumento, las configuraciones particulares, la preparación de las muestras, etc. Por consiguiente, se entiende que cuando se informa que una forma cristalina presenta un

termograma de DSC “sustancialmente” como se ilustra en cualquiera de las Figuras o la expresión “alrededor de” comprende dicha variación. En algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico en alrededor de 211 °C. En algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene un termograma de DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 2. En algunas modalidades, la sal de ácido maleico del Compuesto I tiene un termograma de TGA sustancialmente como se muestra en la Figura 3.

En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, se encuentra aislado sustancialmente. “Sustancialmente aislado/a” significa que la sal o el compuesto se encuentra al menos parcial o sustancialmente separado del entorno en el cual se formó o se detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en las sales que se describen en la presente. La separación sustancial puede incluir composiciones que contengan al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, al menos alrededor de 97 % o al menos alrededor de 99 % en peso de las sales que se describen en la presente, o sales de estas. Los métodos para aislar compuestos y sus sales son habituales en la técnica.

La presente solicitud también se relaciona con una forma de dosificación sólida que comprende una formulación farmacéutica proporcionada en la presente. En algunas modalidades, la forma de dosificación sólida es adecuada para la administración. En algunas modalidades, la forma de dosificación proporcionada en la presente se encuentra en forma de tabletas, cápsulas, pastillas, polvos, sachets y cápsulas de gelatina suaves o duras. En otras modalidades, la forma de dosificación proporcionada en la presente se encuentra en forma de una cápsula.

En la preparación de una formulación, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo,

maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, puede triturarse para proporcionar el tamaño de partícula adecuado antes de combinarse con los otros ingredientes. El maleato del Compuesto I puede triturarse hasta un tamaño de partícula de menos de 200 mesh. Puede ajustarse el tamaño de partícula mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, de alrededor de 40 mesh.

El Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, puede triturarse mediante el uso de procedimientos de trituración conocidos para obtener un tamaño de partícula adecuado para la formación de la tableta y para otros tipos de formulación. Las preparaciones de los compuestos divididas finamente (nanopartículas) se pueden preparar mediante procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, véase Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2002/000196.

Las formulaciones de la invención pueden incluir excipientes adicionales. Los ejemplos de excipientes adicionales adecuados incluyen dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Otros excipientes incluyen: agentes lubricantes, por ejemplo talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes, por ejemplo metil y propilhidroxi-benzoatos; agentes endulzantes; y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención se pueden formular de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona adicionalmente una forma de dosificación que comprende cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente de la invención.

El término "forma de dosificación" hace referencia a una unidad físicamente individual adecuada como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos,

donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

- 5 Para preparar formas de dosificación sólidas tales como cápsulas, el maleato del Compuesto I puede mezclarse con excipientes para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Al hacer referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo generalmente se dispersa de manera
- 10 uniforme por toda la composición, de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, alrededor de 0,1 a alrededor de 1000
- 15 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en una base libre. En algunas modalidades, las formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) comprenden alrededor de 1 a alrededor de 500 mg, alrededor de 1 a alrededor de 200, alrededor de 1 a alrededor de 100, alrededor de 1 a alrededor de 50, o
- 20 alrededor de 1 a alrededor de 30 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos, en una base libre. En algunas modalidades, las formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) comprenden alrededor de 5 a alrededor de 50 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato
- 25 farmacéuticamente aceptable de este, en una base libre, por ejemplo, alrededor de 5 mg, alrededor de 10 mg, alrededor de 15 mg, alrededor de 20 mg, alrededor de 25 mg, alrededor de 30 mg, alrededor de 35 mg, alrededor de 40 mg, alrededor de 45 mg o alrededor de 50 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en una base
- 30 libre. En algunas modalidades, las formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) comprenden alrededor de 5 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo,

maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos, en una base libre. En algunas modalidades, las formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) comprenden alrededor de 15 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos, en una base libre. En algunas modalidades, las formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) comprenden alrededor de 20 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos, en una base libre. En algunas modalidades, las formas de dosificación unitarias (por ejemplo, cápsulas) comprenden alrededor de 25 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de estos, en una base libre.

La forma de dosificación unitaria (por ejemplo, cápsula) del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, puede administrarse a un sujeto una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, etc. Un experto en la técnica sabrá que dos cápsulas de 5 mg pueden administrarse juntas para obtener una dosificación unitaria de 10 mg. El maleato del Compuesto I puede ser eficaz en un intervalo de dosificación amplio y se administra, en general, en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Sin embargo, se comprenderá que la cantidad del compuesto realmente administrado será determinado normalmente por un médico, de acuerdo con las circunstancias pertinentes, que incluyen la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

En algunas modalidades, alrededor de 5 mg a alrededor de 200 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato de este, se administran a un sujeto una vez por día. En algunas modalidades, alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, se administran a un sujeto una vez por día.

En algunas modalidades, alrededor de 5 mg a alrededor de 200 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 10 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día (por ejemplo, dos cápsulas de 5 mg o una cápsula de 10 mg durante un período de 24 horas). En algunas modalidades, alrededor de 15 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 20 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 25 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 40 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 50 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 75 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 80 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 100 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 150 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 160 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día. En algunas modalidades, alrededor de 200 mg del maleato del Compuesto I se administran a un sujeto una vez al día.

Definiciones

El término "sustituido" significa que un átomo o grupo de átomos remplazan formalmente al hidrógeno como "sustituyente" unido a otro grupo. El término "sustituido", a menos que se indique lo contrario, se refiere a cualquier nivel de sustitución, por ejemplo, sustitución mono, di, tri, tetra o penta, en donde se permite

dicha sustitución. Los sustituyentes se seleccionan de manera independiente y la sustitución puede producirse en cualquier posición accesible químicamente. Se ha de comprender que la sustitución en un átomo determinado se encuentra limitada por la valencia. Se ha de comprender que la sustitución en un átomo determinado produce una molécula con estabilidad química. La expresión “sustituido opcionalmente” significa no sustituido o sustituido. El término “sustituido” significa que se quita un átomo de hidrógeno y se reemplaza por un sustituyente. Un sustituyente divalente único, por ejemplo, oxo, puede reemplazar dos átomos de hidrógeno.

10

El término “ C_{n-m} ” indica un intervalo que incluye los extremos, donde n y m son números enteros e indican la cantidad de carbonos. Los ejemplos incluyen C_{1-4} , C_{1-6} y similares.

15 El término “alquilo”, empleado solo o junto con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal o ramificada. El término “alquilo C_{n-m} ” hace referencia a un grupo alquilo con entre n y m átomos de carbono. Un grupo alquilo corresponde formalmente a un alcano con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquilo al resto del compuesto. En
20 algunas modalidades, el grupo alquilo contiene entre 1 y 6 átomos de carbono, entre 1 y 4 átomos de carbono, entre 1 y 3 átomos de carbono o entre 1 y 2 átomos de carbono. Los ejemplos de restos alquilo incluyen, de modo no taxativo, grupos químicos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, isobutilo, sec-butilo; homólogos mayores tales como 2-metilo-1-butilo, n-pentilo, 3-pentilo, n-
25 hexilo, 1,2,2-trimetilopropilo y similares.

El término “alquenilo” empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que corresponde a un grupo alquilo que tiene uno o más doble enlaces carbono-carbono. Un grupo alquenilo
30 corresponde formalmente a un alqueno con un enlace C-H reemplazado por el punto de unión del grupo alquenilo al resto del compuesto. El término “alquenilo C_{n-m} ” hace

referencia a un grupo alquenilo con entre n y m carbonos. En algunas modalidades, el resto alquenilo contiene 2 a 6, 2 a 4 o 2 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, de modo no taxativo, etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, sec-butenilo y similares.

5

El término "heterocicloalquilo", solo o en combinación con otros términos, hace referencia a un anillo o sistema anular no aromático que puede contener opcionalmente uno o más grupos alquilenilo como parte de la estructura anular, con al menos un miembro anular heteroátomo seleccionado de forma independiente

10

de entre nitrógeno, azufre, oxígeno y fósforo, y con 4 a 10 miembros anulares, 4 a 7 miembros anulares o 4 a 6 miembros anulares. El término "heterocicloalquilo" incluye grupos heterocicloalquilo de 4, 5, 6 y 7 miembros monocíclicos. Los grupos heterocicloalquilo pueden incluir sistemas anulares espirocíclicos o mono o

15

bicíclicos (por ejemplo, con dos anillos fusionados o puenteados). En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo es un grupo monocíclico con 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados de forma independiente de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los átomos de carbono formadores de anillos y heteroátomos de un grupo heterocicloalquilo pueden oxidarse opcionalmente para formar un grupo oxo o sulfido u otro enlace oxidado (por ejemplo, C(O), S(O), C(S) o S(O)₂, N-óxido, etc.)

20

o se puede cuaternizar un átomo de nitrógeno. El grupo heterocicloalquilo puede experimentar una unión a través de un átomo de carbono que forme anillo o un heteroátomo que forme anillo. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene de 0 a 3 doble enlaces. En algunas modalidades, el grupo heterocicloalquilo contiene de 0 a 2 doble enlaces. En la definición de

25

heterocicloalquilo también se incluyen restos con uno o más anillos aromáticos fusionados (es decir, con un enlace en común) con el anillo heterocicloalquilo, por ejemplo, derivados benzo o tienilo de piperidina, morfolina, azepina, etc. Un grupo heterocicloalquilo que contiene un anillo aromático fusionado puede unirse a través de cualquier átomo formador de anillos, incluido un átomo formador de anillos del

30

anillo aromático fusionado. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen dihidroxifuranona.

Tal como se utiliza en la presente, el ácido maleico se conoce también como ácido cis-butanodioico.

Tal como se usa en la presente, y a menos que se indique lo contrario en forma específica, "alrededor de" en conexión con un valor numérico o un intervalo de valores que describe una forma sólida o una sal particular, por ejemplo, una temperatura o intervalo de temperaturas específicos, tal como, por ejemplo, al describir una transición vítrea, deshidratación o fusión, un cambio de masa, tal como, por ejemplo, un cambio de masa en función de la temperatura o la humedad, o un pico, tal como, por ejemplo, en un análisis, por ejemplo, mediante RMN ^{13}C , DSC, TGA y XRPD, indica que el valor o intervalo de valores se puede desviar en una medida considerada razonable por un experto en la técnica sin dejar de describir la forma sólida particular. Específicamente, cuando se usa en este contexto, "alrededor de" indica que el valor numérico o intervalo de valores puede variar 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor o intervalo de valores indicado sin dejar de describir la forma sólida particular. En algunas modalidades, el término "alrededor de" indica que el valor numérico o intervalo de valores numéricos puede variar en 5 %. Cuando se usa con referencia a un valor de 2 theta grados, la expresión "alrededor de" hace referencia a $\pm 0,3$ 2-theta grados o $\pm 0,2$ grados 2-theta. Tal como se utiliza en la presente, los términos "mezcla", "mezclar" y "mezclado" hacen referencia a combinar o mezclar diferentes sustancias para obtener una mezcla. La mezcla combinada resultante puede ser homogénea.

Tal como se usa en la presente, el término "hidrato" hace referencia a una forma sólida de la sal de ácido maleico del Compuesto I que incluye agua. El agua en un hidrato se puede encontrar presente en una cantidad estequiométrica con respecto a la cantidad de sal en el sólido o se puede encontrar presente en cantidades variables, tal como se puede encontrar en conexión con hidratos de canales. En algunas modalidades, la sal del ácido maleico del Compuesto I es un monohidrato (por ejemplo, la relación molar de la sal con respecto al agua es alrededor de 1:1). En algunas modalidades, la sal del ácido maleico del Compuesto I es un dihidrato

(por ejemplo, la relación molar de la sal con respecto al agua es alrededor de 1:2). En algunas modalidades, la sal del ácido maleico del Compuesto I es un hemihidrato (por ejemplo, la relación molar de la sal con respecto al agua es alrededor de 2:1). En algunas modalidades, la sal del ácido maleico del Compuesto I tiene una o más moléculas de agua por molécula de sal.

El Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I) farmacéuticamente aceptable, también puede encontrarse en forma de solvato. El término "solvato" significa una forma sólida que incluye moléculas de solvente con el Compuesto I o sus sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sal de ácido maleico). El solvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico o una mezcla de ambos. Un solvato donde el solvente es agua se designa generalmente como un "hidrato" o "forma hidratada". El término "hidrato" significa una forma sólida que incluye moléculas de agua con el Compuesto I o sus sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sal de ácido maleico).

Tal como se utiliza en la presente, el término "anhidro" hace referencia a un compuesto (por ejemplo, Compuesto I, maleato del Compuesto I) que no incluye agua o solventes. Por ejemplo, el Compuesto I o su sal de maleato puede encontrarse en una forma sólida que se encuentra libre de agua o solvente, por ejemplo, menos de 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 % en peso de agua o solvente se encuentra presente.

Tal como se usan en la presente, "pico" o "pico característico" hacen referencia a un reflejo con una altura/intensidad relativa de al menos alrededor del 3 % del pico de altura/intensidad máximo. Tal como se usan en la presente, "cristalino" o "forma cristalina" hacen referencia a una forma sólida cristalina de un compuesto químico que incluye, de modo no taxativo, una forma cristalina con un único componente o con múltiples componentes, por ejemplo, que incluyen solvatos, hidratos, clatratos y cocristales.

Se pretende que la expresión "forma cristalina" haga referencia a una determinada configuración reticulada de una sustancia cristalina. Diferentes formas cristalinas de la misma sustancia suelen tener diferentes retículas cristalinas (por ejemplo, células unitarias), suelen tener diferentes propiedades físicas atribuidas a sus diferentes retículas cristalinas y, en algunos casos, tienen diferente contenido de agua o de solvente. Es posible identificar las diferentes retículas cristalinas mediante métodos de caracterización de estado sólido tales como difracción de rayos X en polvo (XRPD). Otros métodos de caracterización tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas inglés), análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés), ensayos gravimétricos de adsorción de vapor dinámica (DVS, por sus siglas en inglés) y similares ayudan a identificar adicionalmente la forma cristalina, así como a determinar la estabilidad y el contenido de solvente/agua.

Las diferentes formas cristalinas de una sustancia particular, tal como el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, pueden incluir tanto formas anhidras de dicha sustancia como formas solvatadas/hidratadas de dicha sustancia y cada una de las formas anhidras y las formas solvatadas/hidratadas se distinguen por patrones de XRPD diferentes o mediante otros métodos de caracterización de estado sólido, lo que implica diferentes retículas cristalinas. En algunos casos, una forma cristalina simple (por ejemplo, identificada por un patrón de XRPD único) puede tener un contenido de agua o solvente variable, en cuyo caso la retícula se mantiene sustancialmente constante (al igual que el patrón de XRPD) a pesar de la variación de composición respecto al agua y/o el solvente.

Usualmente, se considera que un patrón de XRPD de los reflejos (picos) representa una huella de una forma cristalina particular. Es sabido que las intensidades relativas de los picos de XRPD pueden variar ampliamente, entre otras cosas, de acuerdo con la técnica de preparación de la muestra, la distribución de tamaño de los cristales, los filtros usados, el procedimiento de fijación de la muestra y el instrumento particular empleado. En algunos casos, se pueden observar picos

nuevos o pueden desaparecer picos existentes conforme al tipo de máquina o las configuraciones (por ejemplo, si se utiliza un filtro de Ni o no). Tal como se usa en la presente, el término "pico" hace referencia a un reflejo con una altura/intensidad relativa de al menos alrededor del 3 % o al menos alrededor del 4 % del pico de altura/intensidad máximo. Asimismo, la variación del instrumento y otros factores pueden afectar los valores de 2 theta. Por lo tanto, los picos, tales como los informados en la presente, pueden variar más o menos de alrededor de 0,2° (2 theta) o alrededor de 0,3° (2 theta) y tal como se usa en la presente en el contexto de XRPD, el término "considerablemente" comprende las variaciones anteriormente mencionadas.

De la misma forma, las lecturas de temperatura en relación con DSC, TGA u otros experimentos términos pueden variar alrededor de ± 3 °C dependiendo del instrumento, configuración particular, preparación de la muestra, etc.

Es posible obtener las formas cristalinas de una sustancia mediante una variedad de métodos, tal como es de conocimiento en la técnica. Dichos métodos incluyen, de modo no taxativo, recristalización de fundición, enfriamiento de fundición, recristalización en solvente, recristalización en espacios confinados tales como, por ejemplo, en nanoporos o capilares, recristalización en superficies o plantillas, tales como, por ejemplo, en polímeros, recristalización en presencia de aditivos, tales como, por ejemplo, contramoléculas de cocristales, desolvatación, deshidratación, evaporación rápida, enfriamiento rápido, enfriamiento lento, difusión de vapor, sublimación, exposición a humedad, pulverización y pulverización con eliminación de solvente.

Tal como se usan en la presente, "amorfo" y "forma amorfa" hacen referencia a que la sustancia, componente o producto en cuestión no es sustancialmente cristalino tal como se determinó, por ejemplo, mediante XRPD o a que la sustancia, componente o producto en cuestión, por ejemplo, no es birrefringente cuando se observa en microscopio. En determinadas modalidades, una muestra que

comprende una forma amorfa de una sustancia puede encontrarse sustancialmente libre de otras formas amorfas y/o formas cristalinas. Por ejemplo, se puede identificar una sustancia amorfa por un espectro de XRPD con ausencia de reflejos.

- 5 En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, proporcionado en la presente se prepara en lotes designados como lotes, muestras o preparaciones. Los lotes, muestras o preparaciones pueden incluir el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato
10 farmacéuticamente aceptable de este, en cualquiera de las formas cristalinas o no cristalinas descritas en la presente, incluidas las formas hidratadas y no hidratadas, y mezclas de estas.

- Tal como se usa en la presente, "pureza cristalina" significa el porcentaje de una
15 forma cristalina en una preparación o muestra que puede contener otras formas tales como una forma amorfa del mismo compuesto o al menos una otra forma cristalina del compuesto, o mezclas de estas.

- Tal como se utiliza en la presente, la expresión "sustancialmente cristalino" significa
20 una mayoría del peso de una muestra o preparación del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, es cristalina y el restante de la muestra es una forma no cristalina (por ejemplo, forma amorfa) del Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este. En algunas
25 modalidades, una muestra sustancialmente cristalina tiene al menos alrededor de 95 % de cristalinidad (por ejemplo, alrededor de 5 % de la forma no cristalina), preferentemente, al menos alrededor de 96 % de cristalinidad (por ejemplo, alrededor de 4 % de la forma no cristalina), más preferentemente, al menos alrededor de 97 % de cristalinidad (por ejemplo, alrededor de 3 % de la forma no
30 cristalina), incluso más preferentemente, al menos alrededor de 98 % de cristalinidad (por ejemplo, alrededor de 2 % de la forma no cristalina), incluso más

preferentemente, al menos alrededor de 99 % de cristalinidad (por ejemplo, alrededor de 1 % de la forma no cristalina) y más preferentemente, alrededor de 100 % de cristalinidad (por ejemplo, alrededor de 0 % de la forma no cristalina). En algunas modalidades, "totalmente cristalino" significa al menos alrededor de 99 % o
5 alrededor de 100 % de cristalinidad.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para hacer referencia a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, conforme a la opinión médica, son adecuados para utilizarlos en contacto con
10 los tejidos de personas y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones excesivos proporcionales a una relación de riesgo/beneficio razonable.

Pueden usarse diversos excipientes farmacéuticamente aceptables en las
15 formulaciones descritas en la presente. Tal como se utiliza en la presente, "excipiente farmacéuticamente aceptable" hace referencia a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno, diluyente, solvente o material de encapsulación líquido o sólido. En general, los excipientes son seguros, no tóxicos y no son indeseables biológicamente o en otra
20 forma, e incluyen excipientes aceptables para uso veterinario, así como para uso farmacéutico en personas. En una modalidad, cada componente es farmacéuticamente aceptable, tal como se define en la presente. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.^a ed; Lippincott Williams y Wilkins: Filadelfia, Pa., 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6.^a
25 ed.; Rowe et ál., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3.^a ed.; Ash y Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2.^a ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, Fla., 2009.

30 Tal como se usa en la presente, el término "poner en contacto" se refiere a unir los restos indicados en un sistema in vitro o un sistema in vivo. Por ejemplo, "poner en

contacto" una cinasa AXL/MER con un compuesto de la invención incluye la administración de un compuesto de la presente invención a un individuo o paciente, por ejemplo un ser humano, que tiene una cinasa AXL/MER, así como, por ejemplo, introducir un compuesto de la invención en una muestra que contiene una
5 preparación celular o purificada que contiene la cinasa ALX/MER.

Tal como se usan en la presente, los términos "individuo", "paciente" o "sujeto", utilizados indistintamente, hacen referencia a cualquier animal, lo que incluye mamíferos, preferentemente ratones, ratas, monos, otros roedores, conejos, perros,
10 gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos o primates y, más preferentemente, a seres humanos.

Según se emplea aquí, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que produce la respuesta
15 biológica o medicinal que está siendo buscada en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico. La cantidad terapéuticamente eficaz variará conforme al compuesto, la enfermedad, el trastorno o la afección y su gravedad, y a la edad, peso, etc. del mamífero en tratamiento. En general, se indica que se obtienen resultados
20 satisfactorios con una dosis diaria de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 g/kg de peso corporal del sujeto. En algunas modalidades, una dosis diaria variará de alrededor de 0,10 a 10,0 mg/kg de peso corporal, de alrededor de 1,0 a 3,0 mg/kg de peso corporal, de alrededor de 3 a 10 mg/kg de peso corporal, de alrededor de 3 a 150 mg/kg de peso corporal, de alrededor de 3 a 100 mg/kg de peso corporal,
25 de alrededor de 10 a 100 mg/kg de peso corporal, de alrededor de 10 a 150 mg/kg de peso corporal o de alrededor de 150 a 1000 mg/kg de peso corporal. Es posible administrar la dosis en forma conveniente, por ejemplo, en dosis divididas hasta cuatro veces al día o en forma de liberación continua.

30 Tal como se utilizan en la presente, "tratar" o "tratamiento" hacen referencia a inhibir la enfermedad, por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un

individuo que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología) o mejorar la enfermedad, por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología), tal como disminuir la gravedad de la enfermedad.

Métodos de uso

El Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, de la presente descripción puede modular o inhibir la actividad de cinasas AXL/MER. Por ejemplo, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, puede usarse para inhibir la actividad de las cinasas ALX/MER en una célula o en un individuo o paciente que necesita la inhibición de las cinasas mediante la administración de una cantidad inhibitoria del maleato del Compuesto I a la célula, individuo o paciente. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas que comprenden maleato del Compuesto I pueden usarse para inhibir la actividad de cinasas AXL/MER.

En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato de este, es selectivo para las cinasas AXL/MER sobre una o más de otras cinasas. En algunas modalidades, la selectividad es 2 veces o más, 3 veces o más, 5 veces o más, 10 veces o más, 25 veces o más, 50 veces o más o 100 veces o más.

El Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, puede inhibir uno o más de AXL o MER. En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, es selectivo para una cinasa TAM sobre la otra. "Selectivo/a" significa que el compuesto se une

o inhibe una cinasa TAM con mayor afinidad o potencia, respectivamente, en comparación con una enzima de referencia, tal como otra cinasa TAM. Por ejemplo, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, puede ser selectivo de AXL con respecto a

5 MER y TYRO3, selectivas de MER con respecto a AXL y TYRO3 o selectivas de AXL y MER con respecto a TYRO3. En algunas modalidades, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, es selectiva para AXL y MER sobre TYRO3 y otras cinasas. En algunas modalidades, en la presente se proporciona un método para inhibir las

10 cinasas AXL y MER, el que comprende poner en contacto las cinasas AXL y MER con el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

Como inhibidor de cinasas ALX/MER, el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato de este, es útil en el tratamiento de

15 diversas enfermedades relacionadas con una expresión o actividad anómalas de las cinasas AXL/MER. El Compuesto I o una sal (por ejemplo, maleato del Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, será útil para proporcionar un medio para prevenir el crecimiento o inducir la apoptosis en

20 tumores, particularmente mediante la inhibición de la angiogénesis. Por lo tanto, se anticipa que el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato de Compuesto I), solvato o hidrato de este farmacéuticamente aceptable, probará ser útil en el tratamiento o prevención de trastornos proliferativos tales como cánceres. En particular, los tumores con mutaciones de activación del receptor de tirosina cinasa

25 o regulación por aumento del receptor de tirosina cinasa pueden ser particularmente sensibles a los inhibidores.

En determinadas modalidades, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por cinasas AXL/MER en un paciente que lo

30 necesita, que comprende la etapa de administrarle a dicho paciente una formulación farmacéutica que comprende el Compuesto I, o una sal (por ejemplo, maleato del

Compuesto I), solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

Por ejemplo, la formulación farmacéutica de la descripción es útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de cáncer incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer colorrectal, cáncer de intestino delgado, cáncer de colon, 5 cáncer rectal, cáncer de ano, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, cánceres de laringe, hipofaringe, nasofaringe, orofaringe, labios y boca), cáncer de riñón, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, carcinoma colangiocelular), cáncer de pulmón (por 10 ejemplo, adenocarcinoma, cáncer de pulmón microcítico y carcinomas de pulmón no microcíticos, carcinoma parvicelular y no parvicelular, carcinoma bronquial, adenoma bronquial, blastoma pleuropulmonar), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de útero, cáncer de esófago, cáncer de vesícula, cáncer pancreático (por ejemplo, carcinoma pancreático exócrino), cáncer de 15 estómago, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, cáncer de piel de células de Merkel), y cáncer de cerebro (por ejemplo, astrocitoma, meduloblastoma, ependioma, tumores neuro-ectodérmicos, tumores pineales).

20 Otros cánceres que se pueden tratar con los compuestos de la divulgación incluyen cáncer de huesos, cánceres intraoculares, cánceres ginecológicos, cáncer del sistema endócrino, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de la glándula pituitaria, cáncer de mama triplenegativo (TNBC) y cánceres inducidos por el entorno que incluyen los 25 inducidos por asbestos.

Ejemplos adicionales de cánceres incluyen neoplasias malignas hematopoyéticas como leucemia o linfoma, mieloma múltiple, linfoma linfocítico crónico, leucemia de linfocitos T en adultos, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T cutáneo, 30 leucemia mielógena aguda, linfoma Hodgkin o no Hodgkin, neoplasmas mieloproliferativos (por ejemplo, policitemia vera, trombocitemia esencial y

mielofibrosis primaria), macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células pilosas, linfoma mielogénico crónico, linfoma linfoblástico agudo, linfomas relacionados con el SIDA y linfoma de Burkitt.

- 5 Otros cánceres que se pueden tratar con la formulación farmacéutica de la descripción incluyen tumores de ojo, glioblastoma, melanoma, rabdosarcoma, linfosarcoma y osteosarcoma.

10 Las formulaciones farmacéuticas de la descripción también pueden ser útiles para la inhibición de metástasis tumorales.

En algunas modalidades, las enfermedades e indicaciones que se pueden tratar con la formulación farmacéutica de la presente divulgación incluyen, de modo no taxativo, cánceres hematológicos, sarcomas, cánceres de pulmón, cánceres
15 gastrointestinales, cánceres del tracto genitourinario, cánceres de hígado, cánceres óseos, cánceres del sistema nervioso, cánceres ginecológicos y cánceres de piel.

Los ejemplos de cánceres hematológicos incluyen linfomas y leucemias tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia
20 promielocítica aguda (APL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico de microcítico (SLL), leucemia mielógena crónica (CML), linfoma de linfocitos B grandes difusos (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL), linfoma no Hodgkin (que incluye NHL recidivante o refractario), linfoma folicular (FL), linfoma de Hodgkin, linfoma linfoblástico, enfermedades
25 mieloproliferativas (por ejemplo, mielofibrosis primaria (PMF), policitemia vera (PV), trombocitosis esencial (ET)), síndrome mielodisplásico (MDS), linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T (T-ALL), mieloma múltiple, linfoma de linfocitos T cutáneo, linfoma de linfocitos T periférico, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células pilosas, linfoma mielogénica crónica y linfoma de Burkitt.

30

Los ejemplos de sarcomas incluyen condrosarcoma, sarcoma de Ewing,

osteosarcoma, rabdomiosarcoma, angiosarcoma, fibrosarcoma, liposarcoma, mixoma, rabdomioma, rabdosarcoma, fibroma, lipoma, hamartoma y teratoma.

5 Los ejemplos de cánceres de pulmón incluyen cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de pulmón microcítico, carcinoma broncogénico (de células escamosas, de células pequeñas no diferenciadas, de células grandes no diferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, hamartoma condromatoso y mesotelioma.

10 Los cánceres gastrointestinales de ejemplo incluyen cánceres del esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiosarcoma, linfoma), de estómago (carcinoma, linfoma, leiomiosarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, 15 leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma veloso, hamartoma, leiomioma), cáncer colorrectal y cáncer del conducto biliar.

20 Los ejemplos de cánceres del tracto genitourinario incluyen cánceres de riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], carcinoma de células renales), de vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma, carcinoma urotelial), de próstata (adenocarcinoma, sarcoma) y de testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, 25 fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma).

Los ejemplos de cánceres de hígado incluyen hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular y hemangioma.

30

Los ejemplos de cánceres óseos incluyen sarcoma osteogénico (osteosarcoma),

fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes cordoma, osteocronfoma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes.

Los cánceres del sistema nervioso incluyen cánceres del cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), de las meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebrales (astrocitoma, meduoblastoma, glioma, ependimoma, germinoma (pinealoma), glioblastoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos) y de la médula espinal (neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma), así como neuroblastoma, enfermedad de Lhermitte-Duclos, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC y tumor del eje espinal.

Los cánceres ginecológicos de ejemplo incluyen cánceres de útero (carcinoma endometrial), de cuello de útero (carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario (cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucino, carcinoma sin clasificar), tumores de la célula granulosa tecal, tumores de la célula Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células transparentes, carcinoma de células escamosas, sarcoma botroide (rabdomyosarcoma embrionario) y trompas uterinas (carcinoma).

Los ejemplos de cánceres de piel incluyen melanoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, cáncer de piel de células de Merkel nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma y queloides.

Los ejemplos de cánceres de cabeza y cuello incluyen, glioblastoma, melanoma, rabdosarcoma, linfosarcoma, osteosarcoma, carcinomas de células escamosas,

adenocarcinomas, cáncer oral, cáncer de laringe, cáncer nasofaríngeo, cánceres nasal y paranasal, cánceres de tiroides y paratiroides.

5 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar el carcinoma hepatocelular en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una formulación farmacéutica descrita en la presente.

10 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del rhabdomyosarcoma, cáncer de esófago, cáncer de mama o cáncer de cuello o cabeza, en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una formulación farmacéutica descrita en la presente.

15 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de cáncer hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, melanoma, mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer testicular, cáncer de tiroides, carcinoma de células escamosas, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de útero y rhabdosarcoma.

20 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de cáncer hepatocelular, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de piel,
25 leucemia, mieloma múltiple, linfoma linfocítico crónico, leucemia de linfocitos T adultos, linfoma de linfocitos B, leucemia mielógena aguda, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células pilosas, linfoma de Burkett, glioblastoma, melanoma y rhabdosarcoma.

30 En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, melanoma, carcinoma de células

renales, mieloma múltiple, cáncer gástrico o rhabdomyosarcoma.

El direccionamiento del receptor de tirosina cinasa TAM puede proporcionar un enfoque terapéutico para tratar enfermedades virales (T Shibata, et ál. The Journal of Immunology, 2014, 192, 3569-3581). La presente descripción proporciona un método para tratar infecciones tales como infecciones virales. El método incluye administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica descrita en la presente.

- 10 Los ejemplos de virus que provocan infecciones que pueden tratarse mediante métodos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, virus de inmunodeficiencia humano, papilomavirus humano, influenza, virus de la hepatitis A, B, C o D, adenovirus, poxvirus, virus del herpes simple, citomegalovirus humano, virus del síndrome respiratorio agudo y grave, virus del ébola, virus de Marburgo y
- 15 virus del sarampión. En algunas modalidades, los virus que causan infecciones que se pueden tratar mediante métodos de la presente divulgación incluyen, de modo no taxativo, hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la influenza, flavivirus (por ejemplo: Nilo Occidental, dengue, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre
- 20 amarilla, Zika), echovirus, rinovirus, virus de Coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, papilomavirus, virus molluscum, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de encefalitis arboviral.
- 25 En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar la formación de trombos (J.M.E.M. Cosemans et ál. J. of Thrombosis and Haemostasis 2010, 8, 1797-1808 y A. Angelillo-Scherrer et ál. J. Clin. Invest. 2008, 118:583-596).
- 30 En algunas modalidades, las sales de la presente descripción pueden ser útiles para prevenir o reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, por ejemplo, prevenir o

reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede tener predisposición a la enfermedad, afección o trastorno, pero que todavía no padece o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad.

- 5 Además, se entiende que determinadas características de la invención que, con fines de claridad, se describen en el contexto de modalidades independientes, también se pueden proveer en combinación en una sola modalidad (mientras que se pretende que las modalidades estén combinadas como si hubieran sido escritas en forma múltiple y dependiente). Por el contrario, también pueden proporcionarse
- 10 diversas características de la invención que, por motivos de brevedad, se describen en el contexto de una sola modalidad, de forma separada o en cualquier subcombinación adecuada.

EJEMPLOS

15

La invención se describirá más detalladamente mediante ejemplos específicos. Los ejemplos a continuación se proporcionan con fines ilustrativos y no se pretende que limiten la invención de forma alguna. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente diversos parámetros no esenciales que pueden alterarse o modificarse

20 para producir esencialmente los mismos resultados.

Métodos generales

25

Las purificaciones mediante LC-MS preparativa de algunos de los compuestos preparados se realizaron en sistemas de fraccionamiento dirigido por masas Waters. La configuración, protocolos y software de control básicos del equipo para el funcionamiento de estos sistemas se describe en detalle en la bibliografía. Ver, por ejemplo, "Two-Pump At Column Dilution Configuration for Preparative LC-MS", K. Blom, J. Combi. Chem., 4, 295 (2002); "Optimizing Preparative LC-MS

30 Configurations and Methods for Parallel Synthesis Purification," K. Blom, R. Sparks, J. Doughty, G. Everlof, T. Haque, A. Combs, J. Combi. Chem., 5, 670 (2003); y

"Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization," K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Combi. Chem., 6, 874-883 (2004)). Los compuestos separados típicamente se sometieron a espectrometría de masas y cromatografía analítica de líquidos (LCMS) para verificar la pureza bajo las siguientes condiciones: Instrumento; Agilent serie 1100, LC/MSD, columna: Waters Sunfire™ C₁₈ tamaño de partícula 5 µm, 2,1 x 5,0 mm, amortiguadores: fase móvil A: TFA al 0,025 % en agua y fase móvil B: acetonitrilo; gradiente 2 % a 80 % de B en 3 minutos con velocidad de flujo de 2,0 mL/minuto.

Algunos de los compuestos preparados también se separaron en una escala preparativa mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) con detector de MS o cromatografía ultrarrápida (gel de sílice) como se indica en los Ejemplos. Las típicas condiciones de columna de la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) preparativa son las siguientes:

pH = 2 purificaciones: Waters Sunfire™ C₁₈ tamaño de partícula 5 µm, columna de 19 x 100 mm, elución con fase móvil A: TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1% en agua y fase móvil B: acetonitrilo; la velocidad de flujo fue de 30 mL/minuto, el gradiente de separación se optimizó para cada compuesto usando el protocolo de Optimización de Método Específico de Compuesto como se describe en la bibliografía [véase "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization," K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Generalmente, la tasa de flujo utilizada con la columna de 30 x 100 mm fue de 60 mL/minuto.

pH = 10 purificaciones: Waters XBridge C₁₈ tamaño de partícula 5 µm, columna de 19 x 100 mm, elución con fase móvil A: NH₄OH al 0,15% en agua fase móvil B: acetonitrilo; la velocidad de flujo fue de 30 mL/minuto, el gradiente de separación se optimizó para cada compuesto mediante el protocolo de Optimización de Método Específico de Compuesto como se describe en la bibliografía [véase "Preparative

LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization,” K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)). Generalmente, la velocidad de flujo utilizada con la columna de 30 x 100 mm fue de 60 mL/minuto.

5 Ejemplo 1. Preparación de cápsulas

Las cápsulas del Compuesto I se prepararon de la siguiente manera. El maleato del Compuesto I utilizado en las formulaciones descritas a continuación es cristalino y se prepara de acuerdo con los Ejemplos 4-6.

10

Procedimientos para 20 mg (como base libre)

Tabla 1A. Formulación B de cápsulas de 20 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (mg)
Maleato del Compuesto I	11,80	23,60	354,00
Manitol	51,20	102,40	1536,00
Monohidrato NF de ácido cítrico	20,00	40,00	600,00
Poloxámero 407	10,00	20,0	300,00
Crospovidona	5,00	10,00	150,00
Ácido esteárico	2,00	4,00	60,00
Total	100,00	200,0	3000,00

- 15 El manitol (diluyente), ácido cítrico (modificador pH), crospovidona (desintegrante), poloxámero 407 (tensioactivo) y ácido esteárico (lubricante) se pasaron a través de un tamiz de 40 mesh y se pesaron. Se agregaron excipientes a un vial de vidrio de 20 cc. La sustancia de fármaco triturada se pesó y se agregó al vial. Los componentes se mezclaron a mano con una espátula dentro del vial. La totalidad
- 20 de los contenidos se pasaron luego a través de una malla de 30 mesh (3 veces) para homogenizar la mezcla. La mezcla final se colocó en cápsulas de tamaño 2 (cápsulas Vcaps® Plus (HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) de Capsugel). La relación del Compuesto I como base con respecto al ácido cítrico con respecto al poloxámero 407: 1 con respecto a 2 con respecto a 1.

25

Se prepararon otras cápsulas de 20 mg (Formulaciones A, C, D y E) en una forma similar.

Tabla 1B. Formulación A de cápsulas de 20 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (mg)
Maleato del Compuesto I	11,80	23,60	708,00
Mannitol USP	61,20	122,40	3672,00
Monohidrato USP de ácido cítrico	20,00	40,00	1200,00
Crospovidona NF	5,00	10,00	300,00
Ácido esteárico NF	2,00	4,00	120,00
Total	100,00	200,0	6000,00

5

Tabla 1C. Formulación C de cápsulas de 20 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (mg)
Maleato del Compuesto I	11,80	23,60	354,00
Mannitol USP	56,20	112,40	1686,00
Monohidrato USP de ácido cítrico	20,00	40,00	600,00
Lauril sulfato sódico NF	5,00	10,0	150,00
Crospovidona NF	5,00	10,00	150,00
Ácido esteárico NF	2,00	4,00	60,00
Total	100,00	200,0	3000,00

Tabla 1D. Formulación D de cápsulas de 20 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (mg)
Maleato del Compuesto I	11,80	23,60	354,00
Mannitol USP	71,20	142,40	2136,00
Poloxámer 407 USP-NF	10,00	20,0	300,00
Crospovidona NF	5,00	10,00	150,00
Ácido esteárico NF	2,00	4,00	60,00
Total	100,00	200,0	3000,00

10

Tabla 1E. Formulación E de cápsulas de 20 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (mg)
Maleato del Compuesto I	11,80	23,60	354,00
Mannitol USP	51,20	102,40	1536,00
Monohidrato USP de ácido	20,00	40,00	600,00

Poloxámer 188 USP-NF	10,00	20,0	300,00
Crospovidona NF	5,00	10,00	150,00
Ácido esteárico NF	2,00	4,00	60,00
Total	100,00	200,0	3000,00

Procedimientos para 25 mg (como base libre)

Tabla 1F. Cápsulas de 25 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (g)
Maleato del Compuesto I	7,38	29,50	8,85
Mannitol USP	72,63	290,50	87,15
Monohidrato USP de ácido cítrico	10,00	40,00	12,00
Poloxámero 407 Micro	5,00	20,0	6,00
Crospovidona USP	2,50	10,00	3,00
Ácido esteárico NF	2,00	8,00	2,40
Sílice coloidal USP/NF	0,50	2,00	0,60
Total	100,00	400,0	120,00

5

El manitol, monohidrato de ácido cítrico, poloxámero 407, crospovidona y ácido esteárico tamizaron con un tamiz de 40 mesh y se pesaron. El manitol, ácido cítrico y poloxámero 407 se agregaron a un jarro de vidrio de 500 ml y se mezclaron en una mezcladora turbula durante 5 minutos a velocidad 32. Se agregó la sustancia de fármaco triturada y luego se mezcló durante 5 minutos. La mezcla total se tamizó a través de un tamiz de 40 mesh dos veces y luego se regresó al jarro. Se agregó la crospovidona y se mezcló durante 2 minutos. Se agregó la sílice coloidal a 5 g de la mezcla, se mezcló a mano, se tamizó con un tamiz de 40 mesh y se regresó al jarro junto con el ácido esteárico. La mezcla se mezcló durante 3 minutos adicionales en la mezcladora turbula. La mezcla final se colocó en cápsulas de tamaño 0 (Vcaps Plus-Capsugel). La relación del Compuesto I como base con respecto al ácido cítrico con respecto al poloxámero 407: 1 con respecto a 1,6 con respecto a 0,8.

20

Procedimiento alternativo para 25 mg (como base libre)

Tabla 1G. Cápsulas de 25 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (g)
Maleato del Compuesto I	7,38	29,52	354,24
Mannitol USP	72,62	290,48	3485,76
Monohidrato NF de ácido cítrico	10,00	40,00	480,00
Poloxámero 407 Micro USP/NF	5,00	20,00	240,00
Crospovidona USP	2,50	10,00	120,00
Ácido esteárico NF	2,00	8,00	96,00
Sílice coloidal USP/NF	0,50	2,00	24,00
Total	100,00	400,0	4800,00

5

Los componentes se pesaron. Los materiales a continuación se trituraron a través de un Quadro Comil (malla 039) a una velocidad de 1500 ± 100 RPM: la mitad del manitol necesario, poloxámero 407, maleato del Compuesto I triturado y crospovidona. La mezcla triturada se recolectó. El ácido cítrico y sílice coloidal se

mezclaron en una bolsa, y luego se pasaron a través de Comil seguido del restante del manitol. Ambas mezclas se agregaron a una mezcladora 16Q y se mezclaron durante 18 minutos a 21 RPM. La mezcla resultante se pasó a través del Comil y se mezcló durante 18 minutos adicionales. La mezcla se hizo pasar luego a través del Comill. El ácido esteárico tamizado (30 mesh) se agregó y se mezcló durante 3,5 minutos adicionales. La mezcla final se descargó y se encapsuló en cápsulas de tamaño 0 (V-caps plus) con un encapsulador Bosch en un peso de relleno objetivo de 400 mg. La relación del Compuesto I como base con respecto al ácido cítrico con respecto al poloxámero 407:1 con respecto a 1,6 con respecto a 0,8.

10

15

20

Procedimientos para 5 mg (como base libre)

Tabla 1H. Cápsulas de 5 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (g)
Maleato del Compuesto I	2,95	5,90	118,0

Mannitol USP	59,55	119,10	2382,0
Monohidrato NF de ácido cítrico	20,00	40,00	800,0
Poloxámero 407 Micro USP/NF	10,00	20,0	400,0
Crospovidona USP	5,00	10,00	200,0
Ácido esteárico NF	2,00	4,00	80,0
Sílice coloidal USP/NF	0,50	1,00	20,0
Total	100,00	200,0	4000,0

Los componentes se pesaron. Los siguientes materiales se trituraron a través de un Quadro Comil (malla 039) a una velocidad de 1500 ± 100 RPM: $\frac{1}{2}$ de manitol requerido, poloxámero 407, maleato del Compuesto I triturado y crospovidona. La mezcla triturada se recolectó. El ácido cítrico y sílice coloidal se mezclaron en una bolsa, y luego se pasaron a través de Comil seguido del restante del manitol. Ambas mezclas se agregaron a una mezcladora 16Q y se mezclaron durante 18 minutos a 21 RPM. La mezcla resultante se pasó a través del Comil y se mezcló durante 18 minutos adicionales. La mezcla se hizo pasar luego a través del Comill. El ácido esteárico tamizado (30 mesh) se agregó y se mezcló durante 3,5 minutos adicionales. La mezcla final se descargó y se encapsuló en cápsulas de tamaño 2 (V-caps plus) con un encapsulador Bosch en un peso de relleno objetivo de 200 mg. La relación del Compuesto I como base con respecto al ácido cítrico con respecto al poloxámero 407: 1 con respecto a 8 con respecto a 4.

Procedimientos para 15 mg (como base libre)

Tabla 1I. Cápsulas de 15 mg

Componente	%	mg/cápsula	Lote (g)
Maleato del Compuesto I	4,43	17,72	354,4
Mannitol USP	75,57	302,28	6045,6
Monohidrato NF de ácido cítrico	10,00	40,00	800,0
Poloxámero 407 Micro USP/NF	5,00	20,00	400,0
Crospovidona USP	2,50	10,00	200,0
Ácido esteárico NF	2,00	8,00	160,0
Sílice coloidal USP/NF	0,50	2,00	40,0

Total	100,00	400,0	8000,0
-------	--------	-------	--------

Los componentes se pesaron. Los siguientes materiales se trituraron a través de un Quadro Comil (malla 039) a una velocidad de 1500 ± 100 RPM: $\frac{1}{2}$ de manitol requerido, poloxámero 407, maleato del Compuesto I triturado y crospovidona. La mezcla triturada se recolectó. El ácido cítrico y sílice coloidal se mezclaron en una bolsa, y luego se pasaron a través de Comil seguido del restante del manitol. Ambas mezclas se agregaron a una mezcladora 16Q y se mezclaron durante 18 minutos a 21 RPM. La mezcla resultante se pasó a través del Comil y se mezcló durante 18 minutos adicionales. La mezcla se hizo pasar luego a través del Comill. El ácido esteárico tamizado (30 mesh) se agregó y se mezcló durante 3,5 minutos adicionales. La mezcla final se descargó y se encapsuló en cápsulas de tamaño 0 (V-caps plus) con un encapsulador Bosch en un peso de relleno objetivo de 400 mg. La relación del Compuesto I como base con respecto al ácido cítrico con respecto al poloxámero 407: 1 con respecto a 2,67 con respecto a 1,33.

Ejemplo 2. Estudios de biodisponibilidad

Las cápsulas del maleato del Compuesto I (20 mg como base libre) del Ejemplo 1 se utilizaron en los siguientes estudios de biodisponibilidad. Específicamente, los procedimientos para la preparación de la formulación B en la Tabla 2A se detallan en el Ejemplo 1. Otras formulaciones en la Tabla 2A también se prepararon de forma similar como las cápsulas de 20 mg en el Ejemplo 1.

El fin de este estudio fue determinar el impacto de los componentes de la formulación sobre las propiedades farmacocinéticas del maleato del Compuesto I luego de la administración de las cápsulas de maleato del Compuesto. La parte in vivo de este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones de Nueva Ibera (NIRC) de la Universidad de Louisiana en Lafayette y se adhirió al protocolo de estudio y los procedimientos de operación estándares del NIRC.

- Cuatro monos cynomolgus macho se dejaron en ayunas durante al menos 12 horas y recibieron una dosis oral con maleato del Compuesto I administrada mediante una pistola dosificadora. Se recolectaron muestras de sangre en serie antes de la dosis,
- 5 15, 30 minutos y 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas luego de la dosis. La sangre se colocó en hielo húmedo y se centrifugó bajo refrigeración para obtener plasma y se almacenó congelado a aproximadamente -20 °C. Las muestras de plasma se enviaron a Incyte Corporation (Wilmington, DE) en hielo seco para el análisis.
- 10 Las concentraciones de plasma y orina del Compuesto I se determinaron en Incyte Corporation en condiciones no GLP. El método combinó una extracción de precipitación de proteínas y un análisis LC/MS/MS. Los datos de la concentración de plasma en el tiempo se utilizaron para determinar los parámetros farmacocinéticos para cada animal mediante métodos no compartimentales con el
- 15 uso de una plantilla IDBS E-Workbook Suite PK (E-Workbook versión 9.4.0 construcción 18, IDBS, Inc., Alameda, CA).

Tabla 2A. Resultados de la biodisponibilidad de 20 mg de las cápsulas del Compuesto I

Formulación n.º	Manitol	Ácido cítrico	Crospovidona	Pol. 407	Pol. 188	SLS	Ácido esteárico	Cyno AUC	Parámetro SD
A	X	X	X				X	3620	2980
B	X	X	X	X			X	9080	2630
C	X	X	X			X	X	1390	818
D	X		X	X			X	2750	2560
E	X	X	X		X		X	5980	1330

20

Se llevó a cabo un estudio similar mediante el uso de cápsulas de maleato del Compuesto I (5 mg como una base libre) del Ejemplo 1. Las formulaciones de 5 mg se prepararon con el uso de cápsulas Vcaps® Plus (cápsulas de HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa)) de Capsugel.

Tabla 2B. Comparación de parámetros farmacocinéticos luego de la administración de cápsulas de 5,0 mg en monos Cynomolgus

Parámetro	Valor
C _{máx} (nM)	319±175
T _{máx} (h)	3,25 ± 0,96
AUC _{inf} (nM*h)	1790± 968
t _{1/2} (h)	4,44 ± 1,3

5 Ejemplo 3. Estudio de solubilidad

La solubilidad del maleato del Compuesto I se determinó en una solución acuosa en presencia de diversos tensioactivos a 37 °C. Los tensioactivos incluyeron lauril sulfato sódico (SLS), poloxámero 188 y poloxámero 407 en una concentración de 0,2 % (p/v) en agua; un contenedor sin tensioactivo se incluyó como control. El experimento se llevó a cabo en un baño de disolución Distek 2100 con el uso de 500 ml de medio agitado a 100 RPM (aparato de disolución USP tipo II). 100 mg de la sustancia de fármaco (equivalente de base libre) se agregaron al medio para proporcionar una concentración máxima teórica de 0,20 mg/ml. Se tomaron muestras de 5 ml y se filtraron con un filtro GHP de 0,45 micrones antes del análisis mediante HPLC. Se enumeran a continuación las concentraciones observadas para las muestras luego de 60 minutos de tiempo de agitación.

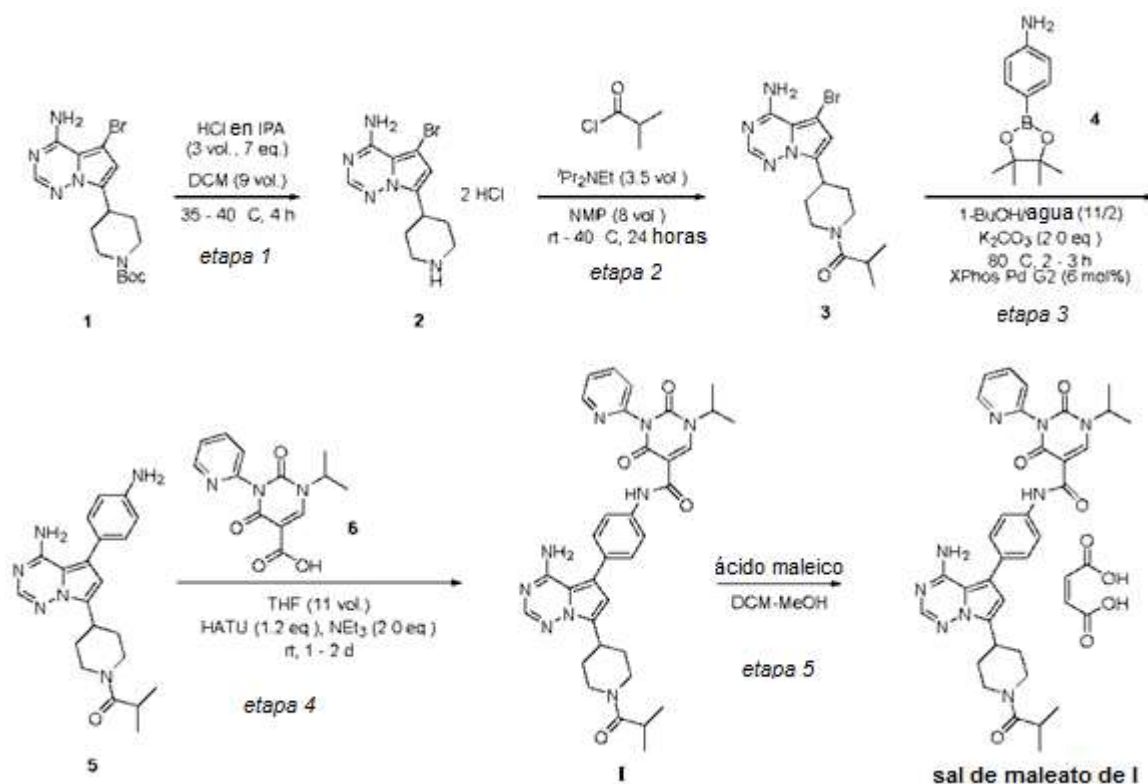
Medio	Concentración (mg/mL)
agua	0,007
SLS al 0,2 %	> 0,20
0,2% de poloxámero 188	0,018
0,2% de poloxámero 407	0,009

Los datos indicaron que la solubilidad de la solución de lauril sulfato sódico fue significativamente superior que el agua o soluciones de poloxámero. La sustancia

de fármaco se disolvió completamente en presencia de SLS al 0,2 % para formar una solución transparente.

Ejemplo 4. Síntesis de maleato de N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (maleato del Compuesto I)

Esquema 1.



Etapa 1. Diclorhidrato de 5-Bromo-7-(piperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amina (Compuesto 2)

En un matraz de fondo redondo de 22 L de 5 bocas, equipado con un agitador mecánico, un manto calefactor, un termopar, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno, se colocó 4-(4-amino-5-bromopirrolo[2,1-

f[1,2,4]triazin-7-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 1, 880 g, 2,221 mol) en diclorometano (DCM, 8,0 L) a temperatura ambiente. A la suspensión se agregó ácido clorhídrico en 2-propanol (5,8 N, 2,7 L, 15,66 mol, 7,05 eq.). La mezcla se calentó hasta 35 °C. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se diluyó con éter terc-butílico de metilo (TBME, 4,5 L). La mezcla resultante se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con TBME (2,0 L). La torta se secó en el filtro con vacío doméstico durante 24 horas para proporcionar diclorhidrato de 5-bromo-7-(piperidin-4-il) pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amina (Compuesto 2, 848 g, 103 %) como un sólido marrón claro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,53 - 9,29 (m, 3H), 8,23 (s, 1H), 6,91 (s, 1H), 3,38 (tt, J = 11,8, 3,6 Hz, 1H), 3,30 (d, J = 12,4 Hz, 2H), 3,00 (dtd, J = 12,8, 10,1, 2,6 Hz, 2H), 2,07 (dd, J = 14,1, 3,8 Hz, 2H), 1,97 - 1,87 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 150,34, 139,32, 138,92, 113,24, 109,67, 95,70, 43,06, 30,57, 26,89 ppm; C₁₁H₁₄BrN₅ (MW 295,0), LCMS (EI) m/e 296,0 (M⁺ + H).

Etapa 2. 1-(4-(4-amino-5-bromopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidin-1-il)-2-metilpropan-1-ona (Compuesto 3).

En un matraz de fondo redondo de 22 L de 5 bocas, equipado con un agitador mecánico, un termopar, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno, se colocó diclorhidrato de 5-bromo-7-(piperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amina (Compuesto 2, 1300 g, 3,522 mol) en piperidinona de N-metilo (NMP, 10 L) a temperatura ambiente. A la suspensión se agregó N,N-diisopropiletilamina (1593 g, 12,3 mol). La mezcla se enfrió hasta 10 °C antes de cargar cloruro de isobutirilo (388 g, 3,645 mol). La reacción se agitó a temperatura ambiente y se monitoreó mediante HPLC. Se agregó cloruro de isobutirilo adicional (22,5 g, 0,211 mol) para consumir todo el material de partida. Una vez que se completó la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado resultante se enfrió hasta 10 °C, se agregó agua (26 L) gradualmente para precipitar el producto. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua (12 L). La torta se secó en el filtro con vacío doméstico durante 48 horas para proporcionar 1-(4-(4-amino-5-bromopirrolo[1,2-

f[1,2,4]triazin-7-il)piperidin-1-il)-2-metilpropan-1-ona (Compuesto 3, 1095 g, 85 %) como un sólido marrón claro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,86 (s, 1H), 6,64 (s, 1H), 4,51 (d, J = 12,6 Hz, 1H), 4,01 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 3,35 - 3,30 (m, 1H), 3,12 (t, J = 12,3 Hz, 1H), 2,91 - 2,84 (m, 1H), 2,64 (t, J = 12,1 Hz, 1H), 2,02 - 1,93 (m, 2H), 1,55-1,42 (m, 2H), 1,02 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 1,00 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 174,50, 155,68, 148,37, 135,22, 111,36, 110,65, 87,27, 45,34, 41,67, 32,91, 31,30, 30,33, 29,49, 20,03, 19,87 ppm; C₁₅H₂₀BrN₅O (MW 365,09), LCMS (EI) m/e 366,1 (M⁺ + H).

10 *Etapas 3. 1-(4-(4-amino-5-(4-aminofenil)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidin-1-il)-2-metilpropan-1-ona (Compuesto 5).*

Un matraz de fondo redondo de 22 L de 5 bocas, equipado con un agitador mecánico, un manto calefactor, un termopar, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno, se cargó con 1-(4-(4-amino-5-bromopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidin-1-il)-2-metilpropan-1-ona (Compuesto 3, 700 g, 1,911 mol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (Compuesto 4, 502 g, 2,293 mol), y carbonato de potasio (528 g, 3,822 mol) en 1-butanol (7,7 L) y agua (1,4 L) a temperatura ambiente. A la mezcla se le agregó cloro(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (XPhos Pd G2, 90 g, 115 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se desgasificó y se rellenó con nitrógeno antes de calentar hasta 80 °C. Después de dos horas a 80 °C, se agregó n-heptano (8 L) a la mezcla de reacción. La suspensión resultante se enfrió hasta temperatura ambiente. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua (6 L). La torta se secó en el filtro con vacío doméstico durante 72 horas para proporcionar 1-(4-(4-amino-5-(4-aminofenil)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidin-1-il)-2-metilpropan-1-ona (Compuesto 5, 648 g, 90 %) como un sólido marrón. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,85 (s, 1H), 7,09 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,65 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,43 (s, 1H), 5,24 (s, 2H), 4,53 (d, J = 12,6 Hz, 1H), 4,04 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 3,38 (ddd, J = 11,8, 8,2, 3,8 Hz, 1H), 3,16 (t, J = 12,7 Hz, 1H), 2,87 (p, J = 6,7 Hz, 1H), 2,71 - 2,66 (m,

1H), 2,08 - 2,00 (m, 2H), 1,61 - 1,58 (m, 2H), 1,02 (d, J = 6,5 Hz, 3H), 1,00 (d, J = 6,5 Hz, 3H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 174,51, 156,31, 148,51, 147,65, 133,98, 130,35, 122,57, 119,37, 114,57, 109,67, 108,85, 45,48, 41,81, 32,97, 31,50, 30,56, 29,50, 20,06, 19,89 ppm; C₂₁H₂₆N₆O (MW 378,48), LCMS (EI) m/e 379,2 (M⁺ + H).

Etapas 4. N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (Compuesto I).

En un matraz de fondo redondo de 22 L con 5 bocas equipado con un agitador mecánico, un acoplador térmico, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno se colocó 1-(4-(4-amino-5-(4-aminofenil)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidin-1-il)-2-metilpropan-1-ona (Compuesto 5, 944 g, 2,494 mol), y clorhidrato de ácido 1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxílico (Compuesto 6, 801 g, 2,569 mol) en tetrahidrofurano (THF, 10 L) a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se agregó trietilamina (NEt₃, 0,695 L, 4,988 mol). Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se dividió uniformemente en dos matraces de fondo redondo de 22 L. Cada matraz se cargó con agua (8 L) a temperatura ambiente. Los sólidos se recogieron mediante filtración. La torta húmeda resultante se colocó nuevamente en un matraz de fondo redondo de 22 L. El matraz se cargó con THF (3,2 L) y agua (10,5 L). La suspensión se calentó hasta 55 °C y se agitó a 55 °C durante dos horas. Los sólidos se recogieron mediante filtración a 30 °C y se lavaron con agua (8 L). La torta se secó en el filtro con vacío doméstico durante 72 horas para proporcionar N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (1425 g, 90 %) como un sólido marrón claro. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10,82 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,64 (ddd, J = 4,8, 1,8, 0,8 Hz, 1H), 8,06 (td, J = 7,7, 1,9 Hz, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,77 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,60 - 7,53 (m, 2H), 7,43 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,58 (s, 1H), 4,78 (hept, J = 6,8 Hz, 1H), 4,54 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 4,06 (d, J = 12,5 Hz, 1H), 3,40 (tt, J =

11,7, 3,5 Hz, 1H), 3,20 (t, J = 12,3 Hz, 1H), 2,91 (hept, J = 6,7 Hz, 1H), 2,69 (t, J = 12,3 Hz, 1H), 2,06 (dd, J = 27,7, 12,3 Hz, 2H), 1,61 (q, J = 11,8 Hz, 1H), 1,55 - 1,47 (m, 1H), 1,44 (d, J = 6,8 Hz, 6H), 1,02 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,00 (d, J = 6,8 Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 174,51, 163,02, 160,31, 156,20, 150,18, 149,98, 149,18, 148,08, 147,79, 139,55, 137,51, 134,45, 131,24, 130,23, 125,09, 124,57, 120,46, 117,98, 109,90, 109,35, 105,27, 51,17, 45,46, 41,79, 32,97, 31,48, 30,54, 29,49, 21,09 (2 -CH₃), 20,07, 19,89 ppm; C₃₄H₃₇N₉O₄ (MW 635,73), LCMS (EI) m/e 636,3 (M⁺ + H).

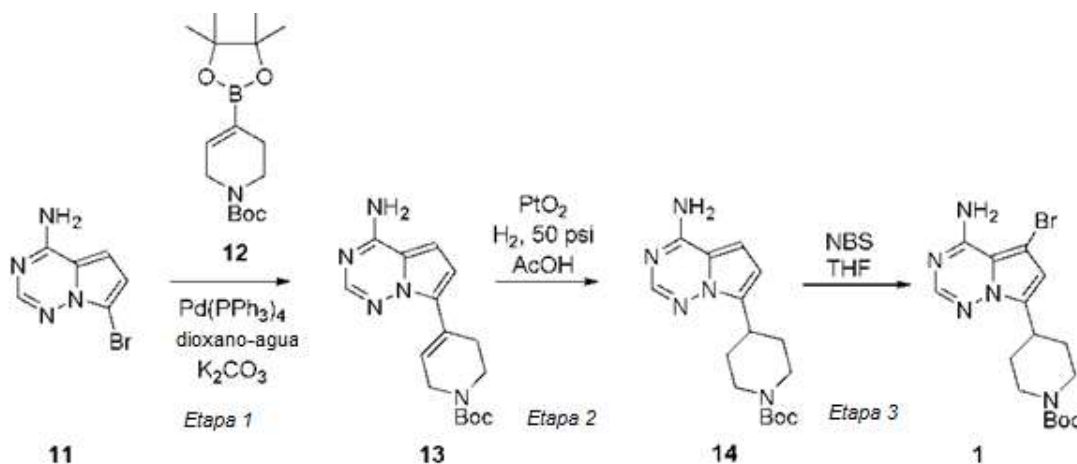
10 *Etapas 5. N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (maleato del Compuesto I).*

En un reactor de 50 L equipado con un agitador mecánico, una camisa de calentamiento, un termopar, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno, se colocó N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (Compuesto I, 1401 g, 2,204 mol) en metanol (MeOH, 10 L) y diclorometano (DCM, 20 L) a temperatura ambiente. La suspensión se calentó hasta 50 °C para proporcionar una solución. A la solución se agregó carbono activado (70 g) y gel de sílice (70 g). Después de la agitación durante 2 horas a 50 °C, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. Al filtrado se le agregó ácido maleico (269 g, 2,314 mol). La mayor parte del DCM se destiló a presión atmosférica. Los sólidos se precipitaron gradualmente. Los sólidos se recogieron mediante filtración a 18 °C y se lavaron con MeOH (3 L). La torta se secó en el filtro con vacío doméstico durante 72 horas para proporcionar maleato de N-(4-(4-amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (maleato del Compuesto I, 1425 g, 86 %) como un sólido blancuzco. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,83 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,65 - 8,63 (m, 1H), 8,06 (td, J = 7,8, 1,9 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,77 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,58 - 7,55 (m, 2H), 7,44 (d, J =

8,5 Hz, 2H), 6,62 (s, 1H), 6,25 (s, 2H), 4,78 (hept, J = 6,7 Hz, 1H), 4,54 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 4,06 (d, J = 12,5 Hz, 1H), 3,40 (tt, J = 11,6, 3,2 Hz, 1H), 3,20 (t, J = 12,3 Hz, 1H), 2,90 (hept, J = 6,6 Hz, 1H), 2,69 (t, J = 12,1 Hz, 1H), 2,09 - 2,01 (m, 2H), 1,65 - 1,57 (m, 1H), 1,56 - 1,49 (m, 1H), 1,44 (d, J = 6,8 Hz, 6H), 1,02 (d, J = 5,5 Hz, 3H), 1,00 (d, J = 5,5 Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 174,52, 167,21, 163,03, 160,33, 155,20, 150,18, 149,99, 149,18, 148,07, 146,26, 139,55, 137,67, 135,32, 131,34, 130,87, 130,22, 125,09, 124,57, 120,49, 119,30, 109,80, 109,47, 105,26, 51,17, 45,43, 41,76, 32,97, 31,45, 30,53, 29,50, 21,09 (2 -CH₃), 20,06, 19,89 ppm; C₃₄H₃₇N₉O₄ (free base, MW 635,73), LCMS (EI) m/e 636,3 (M⁺ + H).

Ejemplo 5. Síntesis de 4-(4-amino-5-bromopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 1 del Esquema 1)

Esquema 2



Etapa 1 4-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5,6-dihidropiridina-1(2H)-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 13)

Un matraz de fondo redondo de 3-L, equipado con un agitador mecánico, un manto calefactor, un termopar, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno, se cargó con 7-bromopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-4-amina

(Compuesto 11, 100 g, 469 mmol) y 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-5,6-dihidropiridina-1(2H)-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 12, 174 g, 563 mmol) en 1,4-dioxano (876 mL) a temperatura ambiente. Al matraz de reacción se le agregó carbonato de potasio (130 g, 939 mmol) y agua (218 g) en secuencia. La mezcla se desgasificó mediante exposición al vacío y se rellenó con atmósfera de nitrógeno tres veces. Después de la adición de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) ($\text{Pd(PPh}_3)_4$, 13,56 g, 11,7 mmol), la mezcla de reacción se desgasificó y se rellenó con nitrógeno tres veces a temperatura ambiente. Luego, la mezcla de reacción se calentó hasta 85 – 90 °C y se agitó a esa temperatura durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se agregó agua (900 mL) en 30 minutos mientras la temperatura interna se encontraba por encima de 50 °C. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. Los sólidos se precipitaron gradualmente. Los sólidos se recogieron mediante filtración a 18 °C, y se lavaron con agua (2 x 250 mL) y éter terc-butílico de metilo (MTBE, 3 x 200 mL). La torta húmeda se colocó nuevamente en el matraz de reacción y se agitó en MTBE (750 mL) a 50 °C durante 1 hora. Los sólidos se recogieron a temperatura ambiente mediante filtración. La torta se secó en un horno de vacío a 50 °C al vacío con barrido de nitrógeno durante 72 horas para proporcionar 4-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5,6-dihidropiridina-1(2H)-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 13, 123,7 g, 84 %) como un sólido marrón. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,89 (s, 1H), 7,69 (s, 2H), 7,00 (s, 1H), 6,91 (d, $J = 4,6$ Hz, 1 H), 6,69 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 4,06 (s, 2H), 3,55 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 2,59 - 2,52 (m, 2H), 1,43 (s, 9H) ppm; $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2$ (MW 315,37), LCMS (EI) m/e 316,1 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Etapas 2. 4-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 14)

Un matraz de 2-L se cargó con 4-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-5,6-dihidropiridina-1(2H)-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 13, 50,0 g, 159 mmol) y óxido de platino (IV) (10,0 g, 44 mmol) en ácido acético (1000 mL) a temperatura ambiente. El matraz se colocó en un agitador Parr con gas hidrógeno a 50 psi.

Después de 16 horas, la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite (50 g) y se lavó con metanol (500 mL). El filtrado se concentró a presión reducida. Al residuo se le agregó éter terc-butílico de metilo (MTBE, 600 mL) a temperatura ambiente. Se agregó una solución de carbonato de potasio (alrededor de 50 g) en agua (1200 mL) a la solución de MTBE para ajustar el valor del pH a 6-7. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua (2 x 300 mL) y n-heptano (2 x 300 mL). La torta se secó en un horno de vacío a 50 °C al vacío con barrido de nitrógeno durante 16 horas para proporcionar 4-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)-piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 14, 49,3 g, 98%) como un sólido marrón claro. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,82 (s, 1H), 7,59 (s, 2H), 6,81 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 6,44 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 4,05 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,25 (tt, J = 11,8, 3,3 Hz, 1H), 2,88 (s, 2H), 1,95 (d, J = 11,9 Hz, 2H), 1,51 (qd, J = 12,6, 4,0 Hz, 2H), 1,42 (s, 9H) ppm; C₁₆H₂₃N₅O₂ (MW 317,39), LCMS (EI) m/e 318,1 (M⁺ + H).

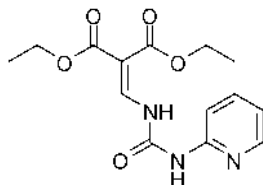
Etapas 3. 4-(4-amino-5-bromopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 1)

Un matraz de fondo redondo de 22-L de 5 bocas, equipado con un agitador mecánico, un termopar, un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno y una salida de nitrógeno, se cargó con 4-(4-aminopirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-7-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 14, 730 g, 2,30 mol) en tetrahidrofurano (THF, 14,0 L) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió hasta 0-5 °C. A la mezcla de reacción se agregó N-bromosuccinimida (NBS, 409 g, 2,30 mol) en 5 minutos mientras la temperatura interna se encontraba por debajo de 15 °C. Después de 1 hora de agitación a menos de 10 °C, se retiraron algunos solventes (9,0 L) a presión reducida. A la solución residual se le agregó una solución de bicarbonato de sodio (140 g, 1,67 mol) en agua (14,0 L) durante 5 minutos. Los sólidos se precipitaron. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua (7,0 L) y n-heptano (4 L). La torta húmeda se secó en el filtro con vacío doméstico durante 48 horas para proporcionar 4-(4-amino-5-bromopirrolo[1,2-

f[1,2,4]triazin-7-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butilo (Compuesto 1, 886 g, 97 %) como un sólido marrón. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,86 (s, 1H), 6,66 (s, 1H), 4,04 (d, J = 11,0 Hz, 2H), 3,30-3,23 (m, 1H), 2,86 (br,s, 2H), 1,92 (d, J = 12,4 Hz, 2H), 1,50 (qd, J = 12,8, 4,1 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 155,68, 154,29, 148,35, 135,37, 111,31, 110,68, 87,29, 79,10, 43,97, 32,63, 30,37, 28,58 ppm; $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{BrN}_5\text{O}_2$ (MW 395,10), LCMS (EI) m/e 396,1 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

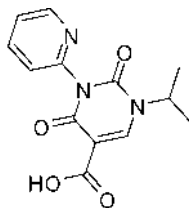
Ejemplo 6. Síntesis de ácido 1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxílico (Compuesto 6 del Esquema 1)

Etapas 3: 2-((3-piridin-2-ilureido)metileno)malonato de dietilo



A una mezcla de 2-(aminometileno)malonato de dietilo (3,0 g, 16,0 mmol) y 2-isocianatopiridina (2,02 g, 16,8 mmol) en 1,2-dicloroetano (9,0 mL) a la se le agregó N,N-diisopropiletilamina (3,6 mL, 20,8 mmol). Luego, la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante la noche, se enfrió hasta temperatura ambiente y se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH de 0 % a 15 % en CH_2Cl_2) para proporcionar el producto (3,18 g, 65 %). Se calculó LCMS para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z = 308,1, Observada: 308,1.

Etapas 4: Ácido 1-Isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxílico



Se agitó una mezcla de 2-((3-(piridin-2-il)ureido)metileno)malonato de dietilo (3,18 g, 10,4 mmol) y NaOEt 2,5 M en EtOH (6,2 mL, 15,5 mmol) en EtOH (25 mL) a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla resultante se diluyó con EtOAc y se lavó/acidificó con solución de ácido cítrico 1 N (30 mL). Se separó la capa orgánica y se extrajo adicionalmente la capa acuosa con 3:1 CHCl₃/alcohol isopropílico (30 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na₂SO₄ y se concentraron para proveer el producto bruto, 2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo, lo cual se utilizó directamente en la siguiente etapa. Se calculó LCMS para C₁₂H₁₂N₃O₄ (M+H)⁺: m/z = 262,1. Observada: 262,2.

Una mezcla de 2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo bruto de la etapa previa, 2-yodopropano (2,06 mL, 20,7 mmol) y Cs₂CO₃ (10,1 g, 31,0 mmol) en DMF (35 mL) se agitó a 70 °C durante 3 horas. Luego, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se diluyó con 3:1 de CHCl₃/alcohol isopropílico (75 mL), se lavó con agua y salmuera, se secó en Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar el producto bruto, 1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo, que se utilizó directamente en la siguiente etapa. Se calculó LCMS para C₁₅H₁₈N₃O₄ (M+H)⁺: m/z = 304,1. Observada: 304,1.

Una mezcla de 1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo bruto de la etapa previa en HCl 4 M en 1,4-dioxano (20 mL, 82 mmol) y agua (5,0 mL) se agitó a 80 °C durante 5 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. Luego, el material resultante se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH de 0 % a 15 % en CH₂Cl₂) para proporcionar el producto como un sólido ligeramente amarillo (1,50 g, 47 % en tres etapas). Se calculó LCMS para C₁₃H₁₄N₃O₄ (M+H)⁺: m/z = 276,1. Observada: 276,1.

Ejemplo 7. Caracterización de estado sólido de maleato de N-(4-(4-Amino-7-(1-isobutirilpiperidin-4-il)pirrolo[1,2-f][1,2,4]triazin-5-il)fenil)-1-isopropil-2,4-dioxo-3-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (maleato del Compuesto I)

5

Difracción de rayos X en polvo (XRPD) del maleato del Compuesto I

La difracción de rayos X en polvo (XRPD) se obtuvo a partir del difractómetro de rayos X en polvo (XRPD) Rigaku MiniFlex. Los procedimientos experimentales generales para XRPD fueron: (1) radiación de rayos X de cobre a 1,054056 Å con filtro K β ; (2) energía de rayos X a 30 KV, 15 mA; y (3) el polvo de la muestra se dispersó en un soporte de muestra sin antecedentes. Las condiciones de medición generales para XRPD fueron: Ángulo de inicio 3 grados; ángulo de terminación 45 grados; Muestreo 0,02 grados; y velocidad de escaneo 2 grados/min. El patrón de XRPD se presenta en la Figura 1 y los datos de XRPD se proporcionan en la Tabla 6A.

10

15

Tabla 6A. Datos de XRPD: Maleato del Compuesto I

2-Theta (°)	Altura	H %
4,3	5452	89,8
5,8	63	1,0
8,4	6068	100
12,6	177	2,9
13,2	331	5,5
15,8	120	2,0
17,1	132	2,2
18,5	230	3,8
20,3	136	2,2
20,9	89	1,5
23,1	114	1,9
24,0	118	1,9
25,2	137	2,3

28,4	45	0,7
29,7	44	0,7
31,5	59	1,0
35,7	102	1,7
42,6	40	0,7

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) del maleato del Compuesto I

La DSC se obtuvo a partir de la calorimetría diferencial de barrido de TA Instruments, modelo Q200 con procesador de muestras automático. Las condiciones del instrumento de DSC fueron las siguientes: 30 – 300°C a 10°C/min; bandeja y tapa de muestra de aluminio Tzero; y flujo de gas nitrógeno a 50 mL/min. El termograma de DSC se muestra en la Figura 2. El termograma de DSC reveló un evento endotérmico importante a una temperatura inicial de 202,9 °C con un pico de temperatura de 211,0 °C que se considera que es la temperatura de descomposición y fusión del compuesto.

Análisis termogravimétrico (TGA) del maleato del Compuesto I

Se obtuvo el TGA de un analizador termogravimétrico de TA Instrument, modelo Q500. Las condiciones experimentales generales para TGA fueron: aumento de 20 °C a 600 °C a 20 °C/min; purga de nitrógeno, flujo de gas a 40 mL/min seguido por equilibrio del flujo de purga; flujo de purga de la muestra a 60 mL/min; bandeja de muestra de platino. El termograma de TGA se muestra en la Figura 3. Se observó una pérdida de peso de alrededor de 0,7 % hasta 150 °C y se estima que está asociada a la pérdida de humedad y solventes residuales. El compuesto comienza a descomponerse en forma significativa por encima de 200 °C.

Otras sales cristalinas

Se han descubierto y preparado otras sales cristalinas del Compuesto I tales como

sal de HCl, sal de monosulfato, sal de hemi-sulfato, sal de mesilato y sal de besilato.

Ejemplo A.

5 Ensayo de autofosforilación de Axl

La autofosforilación de Axl se llevó a cabo mediante la incubación de la proteína Axl recombinante (Life Technologies, PV4275) en solución amortiguadora con Tris 50 mM, pH 7,5, Axl 0,2 mg/ml, ATP 5 mM, MgCl₂ 20 mM y DTT 2 mM a temperatura ambiente durante 1 hora.

Ensayo enzimático de TAM

El amortiguador de ensayo de cinasa contenía HEPES 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 0,01 % y DTT 2 mM. Se transfirió 0,1 ul de los compuestos de ensayo disueltos en DMSO de placas para compuestos comunes a placas de ensayo de 384 pocillos blancas (placas Greiner LUMITRAC). La concentración final de DMSO fue de 1,25 %. Las soluciones enzimáticas de Axl fosforilada 5,1 nM o c-Mer 0,0625 nM (Carna Biosciences, 08-108), o Tyro3 0,366 nM (Life Technologies, PR7480A) se prepararon en amortiguador de ensayo. Una solución madre 1 mM de sustrato peptídico Biotina-EQEDEPEGDYFEWLE-amida SEQ ID NO: 1 (Quality Controlled Biochemicals, MA) disuelto en DMSO se disolvió hasta 1 uM en amortiguador de ensayo con ATP 2000 uM. Se agregaron 4 ul de solución enzimática (o amortiguador de ensayo para el blanco de enzimas) a los pocillos adecuados en cada placa y luego se agregaron 4 ul/pocillo de solución de sustrato para iniciar la reacción. Se protegió a la placa de la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de 4 ul de solución de detección que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM, BSA al 0,05 %, EDTA 45 mM, SA-APC 180 nM (Perkin Elmer, CR130-100) y Eu-W1024 antifosfotirosina PY20 3 nM (Perkin Elmer, AD0067). Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y se midió la señal de HRTF (fluorescencia

homogénea resuelta en el tiempo) en un lector de placas PHERAstar FS (BMG labtech). Se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración y se generó el valor de IC₅₀ a partir de ajuste de curvas con software GraphPad Prism.

- 5 Se observó que el Compuesto I es un inhibidor de uno o más de AXL, MER y TYRO3. Los datos de IC₅₀ para la sal de ácido trifluoroacético del Compuesto I se describen en la patente estadounidense n.º 9,981,975 y se proporcionan a continuación en la Tabla 7A. El símbolo “†” indica una IC₅₀ ≤ 5 nM, “††” indica una IC₅₀ > 5 nM pero ≤ 10 nM, y “†††” indica una IC₅₀ > 10 nM pero ≤ 100 nM.

10

Tabla 7A

Compuesto	IC ₅₀ de Axl	IC ₅₀ de Mer	IC ₅₀ de Tyro3
Sal de ácido trifluoroacético del Compuesto I	†	†	†††
Sal de ácido maleico del Compuesto I	†	†	†††

Ejemplo B. Generación de células de BAF3-AXL, BAF3-MER y BAF3-TYRO3 y ensayo de proliferación celular

15

Se clona el dominio citoplasmático de AXL, MER o TYRO3 fusionado con secuencia de dimerización y etiqueta HA en el vector pMSCV con marcador de resistencia a la puromicina para generar tres construcciones (pMSCV-AXL, pMSCV-MER y pMSCV-TYRO3). Se transfectan las células de BAF3 con las tres construcciones de forma individual mediante electroporación. Se seleccionan y se caracterizan los clones simples independientes de IL3 y resistentes a la puromicina. Se seleccionan células con expresión estable de AXL, MER o TYRO3 y se designan como células

20

BAF3-AXL, BAF3-MER y BAF3-TYRO3.

Se mantienen las líneas celulares BAF3, BAF3-AXL, BAF3-MER o BAF3-TYRO3 en RPMI1640 con FBS al 10 % (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA). Para medir el efecto de los compuestos de ensayo en la viabilidad celular, se colocan 1000 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 384 pocillos en medio de cultivo con una dilución serial del compuesto o DMSO solo durante 48 horas a 37 °C con CO₂ al 5 % y se mide la viabilidad celular mediante ensayo de ATP (ensayo CellTiter-Glo, Promega) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Se convierten los datos a porcentaje de inhibición respecto al control de DMSO y se ajustan las curvas de IC₅₀ con software GraphPad Prism.

Ejemplo C. ELISA BaF3-AXL y ELISA BaF3-MER

Se mantienen células BaF3-AXL o BaF3-MER en medio de cultivo RPMI con FBS al 10 % y puromicina (1 µg/ml, Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA). Para medir el efecto de los compuestos de ensayo sobre AXL fosforilada o MER fosforilada, se colocan las células en placas (5x10⁴ células/pocillo) en una placa de polipropileno con fondo en V (Greiner bio-one) en presencia o ausencia de los compuestos de ensayo diluidos en medio de cultivo y se incuban durante 1 hora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se cosechan mediante centrifugado y se lisan en 110 µl de amortiguador de lisis helado (Cell Signaling) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Halts PI, Thermo Fisher) durante 30 minutos en hielo. El lisado celular se almacena a -80 °C para ELISA. Se preparan las placas de ELISA mediante incubación de placas Costar con anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan las placas y se bloquean con PBS con BSA al 3 %. Se cargan lisados celulares en la placa de ELISA y se incuban a 4 °C durante la noche. Las placas se lavan y se incuban con anticuerpo anti-fosfo-tirosina LANCE Eu-W1024 (PY-20) (Perkin Elmer) en amortiguador de ensayo DELFIA (Perkin Elmer) durante 1 hora y se leen en el lector Pherastar (BMG Labtech). Se convierten los datos en porcentaje de inhibición respecto al control de DMSO y se determina la IC₅₀

mediante el ajuste de la curva de porcentaje de inhibición en función de logaritmo de la concentración de inhibidor con GraphPad Prism.

Ejemplo D. ELISA de AXL fosforilada en H1299

5

Se mantuvieron células H1299 (ATCC), línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas con expresión de Axl, en medio de cultivo RPMI con FBS al 10 % (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA). Para medir el efecto de los compuestos de ensayo en AXL fosforilada, se colocan las células en placas (30 000 células/pocillo) de cultivo de tejido de 96 pocillos (Costar) y se incuban durante la noche a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se agregan los compuestos a una concentración adecuada y se incuban durante 1 hora a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se agrega rhGas6 (R&D Systems, 6 µg/ml) a cada pocillo. Se incuban las placas a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 15 minutos. Las células se cosechan y se lisan en 110 µL de amortiguador de lisis helado (Cell Signaling) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Halts PI, Thermo Fisher). El lisado se incuba durante 1 hora en hielo y se almacena a -80 °C para ELISA. Las placas de ELISA se preparan mediante incubación de placas Costar con anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan las placas y se bloquean con PBS con BSA al 3 %. Se cargan lisados celulares en la placa de ELISA y se incuban a 4 °C durante la noche. Las placas se lavan y se incuban con anticuerpo anti-fosfo-tirosina LANCE Eu-W1024 (PY-20) (Perkin Elmer) en amortiguador de ensayo DELFIA (Perkin Elmer) durante 1 hora y se leen en el lector Pherastar (BMG Labtech). Se convierten los datos en porcentaje de inhibición respecto al control de DMSO y se determina la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva de porcentaje de inhibición en función de logaritmo de la concentración de inhibidor con GraphPad Prism.

25

Ejemplo E. ELISA de AXL fosforilada en H1299 en sangre entera

30

Se mantienen células H1299 (ATCC) en medio de cultivo RPMI con FBS al 10 % (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA). Para medir el efecto de los compuestos

de ensayo en AXL fosforilada en sangre entera, se colocan las células en placas (30 000 células/pocillo) de cultivo de tejido de 96 pocillos (Costar) y se incuban durante la noche a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se mezcla la sangre obtenida de donantes normales con compuestos de ensayo durante 1 hora. Se extrae el medio de cultivo de las células H1299 y se agrega sangre con el compuesto a cada pocillo. Después de 1 hora de incubación a 37 °C con CO₂ al 5 %, se agrega rh-Gas6 (4 µg/ml, R&D Systems) a cada pocillo. Se incuba la placa a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 15 minutos. Las células se lavan con PBS y se lisan en 110 µL de amortiguador de lisis helado (Cell Signaling) con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Halts PI, Thermo Fisher) durante 1 hora en hielo. La placa se almacena a -80 °C para ELISA. Se preparan las placas de ELISA mediante incubación de placas Costar con anticuerpo anti-HA (1 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan las placas y se bloquean con PBS con BSA al 3 %. Se cargan lisados celulares en la placa de ELISA y se incuban a 4 °C durante la noche. Las placas se lavan y se incuban con anticuerpo anti-fosfo-tirosina LANCE Eu-W1024 (PY-20) (Perkin Elmer) en amortiguador de ensayo DELFIA (Perkin Elmer) durante 1 hora y se leen en el lector Pherastar (BMG Labtech). Se convierten los datos en porcentaje de inhibición respecto al control de DMSO y se determina la IC₅₀ mediante el ajuste de la curva de porcentaje de inhibición en función de logaritmo de la concentración de inhibidor con GraphPad Prism.

Ejemplo F. ELISA Insight de células de Akt fosforiladas en G361

Se mantuvieron células G361 (ATCC), línea celular de melanoma maligno con expresión de Mer, en medio de cultivo RPMI con FBS al 10 % (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA). Para medir el efecto de los compuestos de prueba sobre la vía de señalización de MER, las células se colocan en placas a 2×10^4 células/pocillo en volumen de 100 µL en placas de superficie CellBind de 96 pocillos (Corning), y se incuban durante la noche a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se agregan 20 µL de compuestos a concentraciones adecuadas a las células y se incuban durante 1 hora. Se agrega rhGas6 (4 µg/ml, R&D Systems) a cada pocillo y se incuban durante

20 minutos. Se fijan las células mediante la adición de 50 uL de paraformaldehído al 4 % (Electron Microscopy Sciences) en PBS (Corning) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavan y se incuban con 50 uL de triton X-100 al 0,2 % (Sigma) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las placas
5 se lavan y se incuban con 100 uL de amortiguador de bloqueo (BSA al 0,1 % en PBS) durante 30 minutos. Las placas se lavan y se incuban con mAb de conejo Phospho-AKT (Ser473) (D9E) (Cell Signaling) diluido en BSA al 0,1 % (dilución 1:300) a 4 °C durante la noche. La placas se lavan y se incuban con 50 uL de
10 fragmento F(ab')² Alexaflour 488 de IgG de cabra anticonejo (H+L) (Molecular Probes, dilución 1:1000) y Hoechst 33342 (Thermo Fisher, dilución 1:2000) en PBS a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavan con PBS y se leen en Cell Insight CX5 (Thermo Fisher).

Resultarán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las
15 descritas en la presente, para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede. También se pretende que dichas modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cada referencia, incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones, citadas en la presente solicitud se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad.