

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAR EL CÁNCER

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales estadounidenses n.º
5 62/819,332, presentada el 15 de marzo de 2019, y 62/904,241, presentada el 23 de septiembre de 2019, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

El glioblastoma (glioblastoma multiforme; GBM) representa la mayoría de los tumores
10 cerebrales malignos primarios en adultos. La amplificación y mutación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una anomalía genética característica que se encuentra en el GBM (Sugawa, et ál. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8602-8606; Ekstrand, et ál. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 4309-4313). Actualmente se encuentran en desarrollo o en ensayos clínicos para el tratamiento de GBM una variedad de posibles terapias que se dirigen
15 al EGFR o su forma mutante constitutivamente activa, Δ EGFR, incluidos los inhibidores de tirosina cinasa (TKI), anticuerpos monoclonales, vacunas y agentes basados en ARN. Sin embargo, hasta la fecha, su eficacia en la clínica se ha visto limitada por la resistencia a los medicamentos tanto inicial como adquirida (Taylor, et ál. (2012) *Curr. Cancer Drug Targets.* 12:197-209). Una limitación importante es que las terapias actuales como erlotinib, lapatinib,
20 gefitinib y afatinib penetran poco en el cerebro (Razier, et ál. (2010) *Neuro-Oncology* 12:95-103; Reardon, et ál. (2015) *Neuro-Oncology* 17:430-439; Thiessen, et ál. (2010) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65:353-361).

Las terapias moleculares dirigidas han revolucionado el tratamiento del cáncer y han allanado el camino para la medicina de precisión moderna. Sin embargo, a pesar de las alteraciones
25 genéticas procesables bien definidas, los fármacos dirigidos han fracasado en los pacientes con glioblastoma (GBM). Esto se debe en gran parte a la insuficiente penetración en el SNC de la mayoría de los agentes dirigidos a los niveles necesarios para la destrucción del tumor; mediante lo cual potencialmente se evocan mecanismos potentes de adaptación para impulsar la resistencia terapéutica. Si bien las combinaciones de fármacos que inhiben tanto la lesión
30 primaria como las vías de señalización compensatorias son atractivas, estas estrategias de terapia de combinación se han visto obstaculizadas por toxicidades mejoradas que conducen a una dosificación por debajo del umbral de cada fármaco.

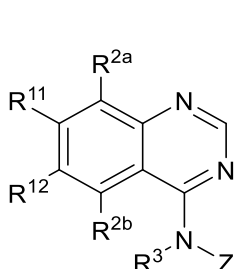
Un abordaje terapéutico alternativo se refiere a un impulsor oncogénico para modificar una propiedad funcional importante para la supervivencia del tumor, lo cual hace que las células
35 sean vulnerables a un segundo impacto ortogonal⁶. Esta estrategia “sintética letal” puede ser particularmente atractiva cuando las redes funcionales reguladas por oncogenes se cruzan con las vías de muerte de las células tumorales. En determinados ejemplos, la señalización oncogénica impulsa el metabolismo de la glucosa para suprimir la apoptosis intrínseca y promover la supervivencia. La inhibición de impulsores oncogénicos con terapias dirigidas
40 puede desencadenar la maquinaria apoptótica intrínseca como consecuencia directa del consumo atenuado de glucosa. La naturaleza entrelazada de estas vías tumorigénicas puede presentar oportunidades terapéuticas para tratamientos de combinación racionales, sin

embargo, esto aún no se ha investigado.

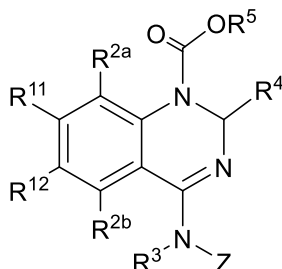
En vista de lo anterior, sigue existiendo una necesidad clínica de agentes quimioterapéuticos penetrantes en el cerebro para el tratamiento del glioblastoma y otros cánceres.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula I o la Fórmula I*:



(I)



(I*)

10 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Z es arilo o heteroarilo;

cada uno de R^{2a} y R^{2b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, halo, CN y NO₂;

R³ es hidrógeno, alquilo o acilo;

R⁴ es alcoxi;

15 R⁵ es alquilo; cada uno de R⁷ y R⁸ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, tal como alcoxialquilo, aralquilo o arilacilo;

R¹¹ es hidrógeno, alquilo, halo, CN, NO₂, OR⁷, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo; y

R¹² es hidrógeno, alquilo, halo, CN, NO₂, OR⁸, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo; o

R¹¹ y R¹² tomados juntos completan un anillo carbocíclico o heterocíclico.

20 En determinados aspectos, la presente descripción proporciona métodos para inhibir EGFR o ΔEGFR, que comprenden administrarle a un sujeto una cantidad de un compuesto de la descripción.

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar el cáncer que comprenden administrarle a un sujeto que necesite un tratamiento para el cáncer una

25 cantidad de un compuesto de la descripción. En algunas modalidades, el cáncer es glioblastoma multiforme.

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar el cáncer que comprenden administrarle a un sujeto un inhibidor del metabolismo de la glucosa y un

estabilizador citoplasmático de p53, donde el inhibidor del metabolismo de la glucosa es un

30 compuesto de la descripción. En algunas modalidades, el cáncer es glioblastoma multiforme.

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula I o la Fórmula I*:

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

35 **La FIG. 1** describe la farmacocinética oral de JGK005 a 10 mg/kg y la de erlotinib a 25 mg/kg. JGK005 tiene una buena penetración en el SNC en comparación con erlotinib.

La FIG. 2 representa la actividad de erlotinib (columnas de la izquierda) y JGK005 (columnas

de la derecha) contra los glioblastomas mutantes de EGFR HK301 y GBM39, respectivamente. JGK005 tiene menor actividad que erlotinib en ambos casos.

La **FIG. 3** representa las actividades de la cinasa EGFR libre de células de erlotinib y JGK010. Ambos compuestos tienen una IC₅₀ de aproximadamente 8 nM.

5 La **FIG. 4** representa las potencias de erlotinib (columnas de la izquierda), JGK005 (columnas centrales) y JGK010 (columnas de la derecha) contra células HK301 y GBM39.

La **FIG. 5** muestra la farmacocinética oral de JGK005 a 10 mg/kg y de JGK010 a 10 mg/kg.

La **FIG. 6** muestra comparaciones de inhibidores de EGFR en múltiples líneas celulares de glioblastoma primario. Columnas 1-4: GBM39 (EGFRvIII), 5-8: GS100 (EGFRwt/EGFRvIII), 9-

10 12: GS017 (A289T), 13-16: GS024 (polisomía EGFR).

La **FIG. 7A** representa la actividad de JGK010 en cáncer de pulmón alterado por EGFR. La **FIG. 7B** representa la actividad de JGK010 en el carcinoma epidermoide EGFR Amp.

La **FIG. 8A** representa la farmacocinética oral de JGK010 a 6 mg/kg. La **FIG. 8B** representa la farmacocinética oral de JGK010 a 10 mg/kg. La **FIG. 8C** representa la farmacocinética IV de
15 JGK010 a 6 mg/kg. La **FIG. 8D** representa la farmacocinética IP de JGK010 a 6 mg/kg.

La **FIG. 9** representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra EGFR Amp WT + vIII HK301.

La **FIG. 10** representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra EGFR vIII Amp GBM 39.

20 La **FIG. 11** representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra células HK301.

La **FIG. 12** representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra células GBM 39.

La **FIG. 13A** representa la inhibición de fósforo-EGFR vIII de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción. La **FIG. 13B** representa la inhibición de fósforo-EGFR vIII de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción.

La **FIG. 14A** describe la farmacocinética de JGK005. La **FIG. 14B** describe la farmacocinética de JGK005.

La **FIG. 15A** representa la farmacocinética de JGK038. La **FIG. 15B** representa la
30 farmacocinética de JGK038.

La **FIG. 16A** representa la farmacocinética de JGK010. La **FIG. 16B** representa la farmacocinética de JGK010.

La **FIG. 17A** representa la farmacocinética de JGK037. La **FIG. 17B** representa la farmacocinética de JGK037.

35 La **FIG. 18A** representa una comparación de la farmacocinética de cerebro/sangre de ratón entre Erlotinib y JGK037. La **FIG. 18B** representa una comparación de la farmacocinética de cerebro/sangre de ratón entre Erlotinib y JGK037.

La **FIG. 19** representa la penetración cerebral de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción.

40 La **FIG. 20** representa el efecto del tratamiento con un vehículo o con JGK037 sobre el cambio de RLU.

Las **FIG. 21A-21F** representan la inhibición del metabolismo de la glucosa impulsado por EGFR

que induce una muerte celular mínima pero prepara a las células de GBM para la apoptosis. La **FIG. 21A** representa el cambio porcentual en la absorción de ^{18}F -FDG después de 4 horas de tratamiento con erlotinib en relación con el vehículo en 19 gliomasferas de GBM derivadas de pacientes. Los “respondedores metabólicos” (azul) son muestras que presentan una

5 disminución significativa en la absorción de ^{18}F -FDG en relación con el vehículo, mientras que las muestras “no respondedores” (rojo) no presentan una disminución significativa. La **FIG. 21B** representa el cambio porcentual en el consumo de glucosa y la producción de lactato con 12 horas de tratamiento con erlotinib en relación con el vehículo. Las mediciones se realizan con el analizador Nova Biomedical BioProfile. La **FIG. 21C** representa la tinción con anexina V de

10 pacientes respondedores (azul, $n=10$) o no respondedores (rojo, $n=9$) después del tratamiento con erlotinib durante 72 horas. La **FIG. 21D** representa el cambio porcentual, en relación con el control de vehículo, en el cebado según lo determinado por la liberación del citocromo c después de la exposición a cada péptido BH3 (BIM, BID o PUMA) en respondedores metabólicos o no respondedores tratados con erlotinib durante 24 horas. La **FIG. 21E** representa a la izquierda:

15 inmunotransferencia de lisado de células HK301 enteras que sobreexpresan el control de GFP o GLUT1 y GLUT3 (GLUT1/3). A la derecha: cambios en el consumo de glucosa o producción de lactato de HK301-GFP o HK301-GLUT1/3 después de 12 horas de tratamiento con erlotinib. Los valores son relativos al control de vehículo. La **FIG. 21F** representa el uso de células HK301-GFP o HK301-GLUT1/3. La concentración de erlotinib para todos los experimentos fue de $1\text{ }\mu\text{M}$.

20 Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

Las **FIG. 22A-22H** representan que p53 citoplasmática vincula el EGFR a la apoptosis intrínseca. La **FIG. 22A** representa la inmunotransferencia de las proteínas indicadas en dos

25 respondedores (HK301 y HK336) que expresan la proteína CRISPR/CAS9 con ARN guía de control (sgCtrl) o ARN guía de p53 (p53KO). La **FIG. 22B** representa el cambio porcentual, en relación con el control de vehículo, en el cebado según lo determinado por la liberación del citocromo c después de la exposición al péptido BIM en células sgCtrl y p53KO tratadas con erlotinib durante 24 horas. La **FIG. 22C** representa la inmunotransferencia de las proteínas

30 indicadas en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cito} y p53KO + p53^{wt}. La **FIG. 22D** representa que la inmunofluorescencia de la proteína p53 en combinación con tinción con DAPI revela la localización de proteínas en HK301 sgCtrl, p53KO + p53^{cito} y p53KO + p53^{wt} (barras de escala = $20\text{ }\mu\text{m}$). Las gliomasferas se disociaron primero en una sola célula y se adhirieron a las placas de 96 pocillos mediante el uso de Cell-Tak (Corning) de acuerdo con las instrucciones del

35 fabricante. A continuación, las células adheridas se fijaron con metanol enfriado con hielo durante 10 min y luego se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se incubaron con solución de bloqueo que contenía FBS al 10% y BSA al 3% en PBS durante 1 hora y posteriormente se incubaron con anticuerpo de p53 (Santa Cruz, SC-126, dilución 1:50) durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, las células se incubaron con anticuerpo secundario (Alexa

40 Fluor 647, dilución 1:2000) durante una hora y tinción DAPI durante 10 minutos, luego se tomaron imágenes mediante el uso de un microscopio Nikon TI Eclipse equipado con una cámara fluorescente Cascade II (Roper Scientific). Se obtuvieron imágenes de las células con

emisiones a 461 nM y 647 nM y luego se procesaron mediante el uso de el software de análisis NIS-Elements AR. La **FIG. 22E** representa los cambios en los niveles de ARNm indicados después del tratamiento con doxorubicina 100 nM durante 24 horas en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cyto} y p53KO + p53^{wt}. Los niveles se normalizaron a los de las respectivas células tratadas con DMSO. La **FIG. 22F** representa datos similares a los de **22B** pero en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cyto} y p53KO + p53^{wt}. La **FIG. 22G** representa datos similares a los de **22E** pero en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{R175H}, p53KO + p53^{R273H} y p53KO + p53^{NES}. La **FIG. 22H** representa datos similares a los de **22B** y **22F** pero en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{R175H}, p53KO + p53^{R273H} y p53KO + p53^{NES}. La concentración de erlotinib para todos los experimentos fue de 1 µM. Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba *t* de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios ± s.e.m. de tres experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Las **FIG. 23A-23F** representan Bcl-xL previene la muerte celular de GBM al unirse y secuestrar p53 citoplasmática en respondedores metabólicos de EGFRi. La **FIG. 23A** representa la inmunoprecipitación de p53 en dos respondedores metabólicos (HK301 y GBM39) después de 24 horas de tratamiento con erlotinib. El inmunoprecipitado se sondeó con los anticuerpos indicados. A continuación se muestran los respectivos lisados de preinmunoprecipitación (entrada). La **FIG. 23B** muestra datos similares a los de **23A** pero en dos no respondedores (HK393 y HK254). La **FIG. 23C** muestra datos similares a **23A** y **23B** pero en HK301-GFP y HK301-GLUT1/3. A la derecha están las inmunotransferencias para las entradas indicadas. La **FIG. 23D** muestra que HK301 se trató durante 24 horas con erlotinib, WEHI-539 o ambos y se realizó inmunoprecipitación e inmunotransferencia como se describió anteriormente. La **FIG. 23E** representa la tinción de anexina V de dos respondedores (GBM39 y HK301) y un no respondedor (HK393) después de 72 horas de tratamiento con erlotinib, WEHI-539 o ambos. La **FIG. 23F** representa la tinción de anexina V de HK301-GFP y HK301-GLUT1/3 después de 72 horas de tratamiento con erlotinib, wehi-539 o ambos. Las concentraciones de erlotinib y WEHI-539 para todos los experimentos fueron 1 µM y 5 µM, respectivamente. Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba *t* de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios ± s.e.m. de tres experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01.

Las **FIG. 24A-24G** representan la letalidad sinérgica del direccionamiento combinado de EGFR y p53. La **FIG. 24A** representa un resumen de alteraciones en EGFR y genes involucrados en la regulación de p53 en 273 muestras de GBM. Las alteraciones genéticas en EGFR (amp/mutación) son mutuamente excluyentes de las de p53. Tal como se muestra, las alteraciones de EGFR están en el lado izquierdo de la tabla, mientras que la mayoría de las alteraciones en p53 están a la derecha. La **FIG. 24B** representa una tabla que indica las asociaciones significativas entre alteraciones en *EGFR* y genes implicados en la vía de p53. La **FIG. 24C** representa la tinción con anexina V de un respondedor metabólico (izquierda: HK301) y un no respondedor (derecha: GS017) tratados con concentraciones variables de erlotinib, nutlina y en combinación representados como una matriz de titulación de dosis. La **FIG. 24D** representa la titulación de la dosis de erlotinib y nutlina como se describe en **24C** y se realizó en 10 respondedores metabólicos y 6 no respondedores y se calculó la puntuación de sinergia

(véase la sección Materiales y métodos). La **FIG. 24E** representa la tinción de anexina V de HK301-GFP y HK301 GLUT1/3 después de 72 horas de tratamiento con erlotinib, nutlina o ambos. La **FIG. 24F** representa lo mismo que **24E** pero en HK301-sgCtrl y HK301-p53KO. La **FIG. 24G** respresenta HK301 que se trató durante 24 horas con erlotinib, nutlina o combinación.

5 La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpo de control de inmunoglobulina G o anticuerpo anti-p53, y el inmunoprecipitado se sondeó con los anticuerpos indicados. A continuación se muestran los respectivos lisados de preinmunoprecipitación (entrada). Todos los datos son representativos de al menos $n=3$ experimentos independientes, media $\pm$ SEM. A menos que se indique, las concentraciones de erlotinib y nutlina para todos los experimentos fueron 1 μ M y 2,5 μ M, respectivamente. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Las **FIG. 25A-25F** representan que la modulación del metabolismo de la glucosa ceba a los no respondedores de EGFRi para la muerte celular mediada por p53. La **FIG. 25A** representa el cambio porcentual en la absorción de ^{18}F -FDG después de 4 horas de tratamiento con erlotinib, 2DG o pictilisib en relación con el vehículo en HK393 y HK254. La **FIG. 25B** representa el cambio porcentual, en relación con el control de vehículo, en el cebado según lo determinado por la liberación del citocromo c después de la exposición al péptido BIM en HK393 y HK254 después de erlotinib, 2DG o pictilisib durante 24 horas. La **FIG. 25C** representa datos similares a los de **25B** pero en HK393 sgCtrl y p53KO. La **FIG. 25D** representa la inmunoprecipitación de p53 en HK393 y HK254 después de 24 horas de tratamiento con 2DG o pictilisib. El
 15 inmunoprecipitado se sondeó con los anticuerpos indicados. A continuación se muestran los respectivos lisados de preinmunoprecipitación (entrada). La **FIG. 25E** representa la puntuación de sinergia de varios fármacos (erlotinib, 2DG y pictilisib) en combinación con nutlina en HK393 y HK254. La **FIG. 25F** representa la tinción con anexina V de HK393 sgCtrl y HK393 p53KO después de 72 horas de tratamiento con 2DG, pictilisib, 2DG + nutlina o pictilisib + nutlina. A
 20 menos que se indique, las concentraciones de erlotinib, 2DG, pictilisib y nutlina para todos los experimentos fueron 1 μ M, 1 mM, 1 μ M y 2,5 μ M, respectivamente. Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

30 Las **FIG. 26A-26H** representan el direccionamiento combinado de la absorción de glucosa impulsada por EGFR y p53 suprime el crecimiento tumoral *in vivo*. La **FIG. 26A** representa las imágenes de PET/TC con ^{18}F -FDG de xenoinjertos intracraneales de GBM39 antes y después de 15 horas de tratamiento con erlotinib (75 mg/kg). La **FIG. 26B** muestra xenoinjertos intracraneales de GBM39 que se trataron con vehículo ($n=5$), 75 mg/kg de erlotinib ($n=7$), 50
 35 mg/kg de idasanutlina ($n=5$) o en combinación diaria ($n=12$) y la carga tumoral se evaluó en los días indicados mediante el uso de luciferasa de *gaussia* secretada (véase la sección Materiales y métodos). La **FIG. 26C** muestra datos similares a los de **26A** pero en xenoinjertos intracraneales de HK393. La **FIG. 26D** muestra datos similares a los de **26B**, pero en xenoinjertos intracraneales de HK393 ($n=7$ para todos los grupos). La **FIG. 25E** representa el porcentaje de supervivencia de **26B**. La **FIG. 26F** representa el porcentaje de supervivencia de **26C**. La **FIG. 26G** representa el porcentaje de supervivencia del respondedor metabólico HK336 después de los tratamientos indicados durante 25 días y luego liberado del fármaco ($n=7$ para
 40

todos los grupos). **La FIG. 26H** representa el porcentaje de supervivencia del no respondedor GS025 después de los tratamientos indicados durante 25 días y luego liberado del fármaco ($n=9$ para todos los grupos). Las comparaciones para **26B** y **26D** utilizaron conjuntos de datos de las últimas mediciones y se realizaron mediante el uso de una prueba t no pareada de dos colas.

5 Los datos representan valores medios $\pm$ s.e.m. ** $p < 0,01$.

Las **FIG. 27A-27G** representan la caracterización de líneas celulares de GBM después de la inhibición de EGFR. La **FIG. 27A** representa el cambio porcentual en la absorción de ^{18}F -FDG en los momentos indicados del tratamiento con erlotinib en relación con el vehículo en dos respondedores metabólicos (HK301 y GBM39). La **FIG. 27B** representa una
 10 inmunotransferencia de proteínas indicadas de un respondedor metabólico (HK301) y no respondedor (HK217) después de la atenuación genética de EGFR con ARNip. La **FIG. 27C** representa el cambio porcentual en la absorción de ^{18}F -FDG en HK301 y HK217 después de la atenuación genética de EGFR. La **FIG. 27D** representa el cambio en el consumo de glucosa con 12 horas de tratamiento con erlotinib en tres respondedores metabólicos (HK301, GBM39,
 15 HK390) y tres no respondedores (HK393, HK217, HK254). Las mediciones se realizan con el analizador Nova Biomedical BioProfile. **La FIG. 27E** representa el cambio en la producción de lactato con 12 horas de tratamiento con erlotinib en tres respondedores metabólicos (HK301, GBM39, HK390) y tres no respondedores (HK393, HK217, HK254). Las mediciones se realizan con el analizador Nova Biomedical BioProfile. **FIG. 27F** representa mediciones de ECAR basal de dos respondedores (HK301 y GBM39, en azul) y dos no respondedores (HK217 y HK393,
 20 en rojo) después de 12 horas de tratamiento con erlotinib. La **FIG. 27G** representa el cambio en el consumo de glutamina después de 12 horas de tratamiento con erlotinib, según lo medido mediante el analizador Nova Biomedical BioProfile. Las concentraciones de erlotinib para todos los experimentos fue de $1\text{ }\mu\text{M}$. Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Las FIG. 28A-28B representan que las alteraciones en la señalización posterior después de que la inhibición de EGFR se correlacionan con la respuesta metabólica. **La FIG. 28A** representa una inmunotransferencia de proteínas indicadas después de 4 horas de tratamiento
 30 con erlotinib en respondedores metabólicos. **La FIG. 28B** representa una inmunotransferencia de proteínas indicadas después de 4 horas de tratamiento con erlotinib en no respondedores metabólicos.

Las **FIG. 29A-29B** describen la caracterización genética de líneas celulares de GBM derivadas de pacientes. La **FIG. 29A** representa los antecedentes genéticos en un panel de líneas de GBM. La **FIG. 29B** representa la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) de HK390, HK336,
 35 HK254 y HK393 que muestra la polisomía de *EGFR*. La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se realizó mediante el uso de una sonda de EGFR (rojo)/CEP 7 (verde) de dos colores marcada con fluorescencia disponible comercialmente (Abbott-Molecular). La hibridación FISH y los análisis se realizaron en líneas celulares, siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante.
 40 Las células se contratiñeron con DAPI y se obtuvieron imágenes de las señales de la sonda fluorescente con un microscopio fluorescente Zeiss (Axiophot) equipado con filtros de colores dobles y triples.

Las **FIG. 30A-30B** representan que la inhibición de EGFR cambia el equilibrio apoptótico en respondedores metabólicos. La **FIG. 30A** representa una inmunotransferencia de proteínas indicadas después de 24 horas de tratamiento con erlotinib en respondedores metabólicos (GBM39, HK301, y HK336) y no respondedores (HK217, HK393, y HK254). La **FIG. 30B** representa un ejemplo de análisis de perfil dinámico de BH3 en un respondedor metabólico (HK301). Izquierda: se mide el porcentaje de liberación de citocromo *c* después de la exposición a varios péptidos a las concentraciones indicadas. Derecha: se calcula la diferencia en la liberación de citocromo *c* entre las células tratadas con vehículo y las células tratadas con erlotinib para obtener el porcentaje de cebado. Las concentraciones de erlotinib para todos los experimentos fueron de 1 μ M.

Las **FIG. 31A-31C** representan que la sobreexpresión de GLUT1/3 rescata el metabolismo atenuado de la glucosa causado por la inhibición de EGFR. La **FIG. 31A** representa el cambio en el consumo de glucosa y la producción de lactato con 12 horas de tratamiento con erlotinib en HK301-GFP y HK301 GLUT1/3. Las mediciones se realizan con el analizador Nova Biomedical BioProfile. La **FIG. 31B** representa a la izquierda: inmunotransferencia de lisado de células GBM39 enteras que sobreexpresan el control de GFP o GLUT1 y GLUT3 (GLUT1/3). A la derecha: cambios en el consumo de glucosa o producción de lactato de GBM39-GFP o GBM39-GLUT1/3 después de 12 horas de tratamiento con erlotinib. Los valores son relativos al control de vehículo. La **FIG. 31C** muestra datos similares a los de 35A pero en GBM39-GFP y GBM39-GLUT1/3. Las concentraciones de erlotinib para todos los experimentos fueron de 1 μ M. Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba *t* de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Las **FIG. 32A-32I** representan que se requiere p53 citoplasmática para el cebado apoptótico mediado por EGFRi. La **FIG. 32A** representa el cambio porcentual en la absorción de ^{18}F -FDG después de 4 horas de tratamiento con erlotinib en células HK301 sgCtrl y p53 KO (media $\pm$ s.d., $n = 3$). La **FIG. 32B** representa los niveles relativos de ARNm de genes regulados por p53 después de 24 horas de tratamiento con erlotinib 1 μ M o tratamiento con doxorrubicina 100 nM en HK301 (respondedor metabólico). La **FIG. 32C** representa células HK301 infectadas con un sistema indicador de p53-luciferasa y se midió la actividad de p53 después de 24 horas de tratamiento con erlotinib 1 μ M (media $\pm$ s.d., $n = 3$). Los resultados que se muestran son representativos de dos experimentos independientes. La **FIG. 32D** representa la inmunotransferencia de las proteínas indicadas en HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cito} y p53KO + p53^{wt}. La **FIG. 32E** representa la inmunofluorescencia de la proteína p53 en combinación con tinción con DAPI para revelar la localización de proteínas en HK336 sgCtrl, p53KO + p53^{cito} y p53KO + p53^{wt} (barras de escala = 20 μ m). La inmunofluorescencia se realizó como se describió previamente. La **FIG. 32F** representa los cambios en los niveles de ARNm indicados después del tratamiento con doxorrubicina 100 nM durante 24 horas en HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cito} y p53KO + p53^{wt} (media $\pm$ s.d., $n = 3$). Los niveles se normalizaron a los de las respectivas células tratadas con DMSO. La **FIG. 32G** representa el cambio porcentual, en relación con el control de vehículo, en el cebado apoptótico según lo determinado por la liberación del citocromo *c* después de la exposición al péptido BIM en células HK336 sgCtrl,

p53KO, p53KO + p53^{cito} y p53KO + p53^{wt} tratadas con erlotinib durante 24 horas (media $\pm$ s.d., n = 2). Los resultados que se muestran son representativos de dos experimentos independientes. **La FIG. 32H** representa una inmunotransferencia de las proteínas indicadas en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{R175H}, p53KO + p53^{R273H} y p53KO + p53^{NES}. **La FIG. 32I** representa el cambio porcentual en el cebado en HK301 después de 24 horas de tratamiento con erlotinib con o sin pretratamiento con PFT μ (10 μ M durante 2 horas) (media $\pm$ s.d., n = 2). Los resultados que se muestran son representativos de dos experimentos independientes.

Las **FIG. 33A-33D** representan la inhibición del metabolismo de la glucosa impulsado por EGFR que induce una dependencia de Bcl-xL a través de funciones de p53 citoplasmática. **La FIG. 33A** representa el cambio porcentual, en relación con el control de vehículo, en el cebado según lo determinado por la liberación del citocromo c después de la exposición a los péptidos BAD y HRK respondedores metabólicos (HK301 y HK336) o no respondedores (HK229) tratados con erlotinib. **La FIG. 33B** representa a la izquierda: inmunoprecipitación de p53 en GBM39-GFP y GBM39-GLUT1/3 después de 24 horas de tratamiento con erlotinib. El inmunoprecipitado se sondeó con los anticuerpos indicados. A la derecha: lisados respectivos de preinmunoprecipitación (entrada). **La FIG. 33C** representa la tinción de anexina V de HK301 (izquierda) y HK336 (derecha) sgCtrl, p53KO, p53 KO + p53^{cito}, y p53KO + p53^{wt} después de 72 horas de tratamiento con erlotinib, WEHI-539 o combinación. **La FIG. 33D** representa datos similares a los de **33C** pero en GBM39-GFP y GBM39-GLUT1/3. Las concentraciones de erlotinib y WEHI-539 para todos los experimentos fue de 1 μ M. Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba *t* de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001.

Las **FIG. 34A-34H** representan que la inhibición del metabolismo de la glucosa regulado por EGFR y la activación de p53 promueven la apoptosis intrínseca en GBM. **La FIG. 34A** representa la inmunotransferencia de las proteínas indicadas después de 24 horas de erlotinib, nutlina o combinación en dos respondedores metabólicos (HK301 y GBM39). **La FIG. 34B** representa la tinción con anexina V en HK301 y HK217 después de la atenuación genética de EGFR y el posterior tratamiento con nutlina durante 72 horas. **La FIG. 34C** representa la detección de oligomerización de BAX en HK301-GFP y HK301-GLUT1/GLUT3. Después de 24 horas de tratamiento indicado, las células se recogieron y se incubaron en BMH 1 mM para promover la reticulación de proteínas y se inmunotransfirieron con los anticuerpos indicados. Debajo de BAX se encuentra la inmunotransferencia para el citocromo c citosólico después del fraccionamiento celular. **La FIG. 34D** representa en la parte superior: inmunotransferencia de las proteínas indicadas en HK301-GFP y HK301-HA-BclxL. Parte inferior: tinción de anexina V en HK301-GFP y HK301-HA-BclxL después de 72 horas de tratamiento con erlotinib, nutlina o combinación. **La FIG. 34E** muestra la tinción con anexina V de HK301 después de 72 horas de pretratamiento con erlotinib, nutlina o la combinación +/- PFT μ (10 μ M durante 2 horas). **La FIG. 34F** representa la tinción de anexina V de HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{R175H}, p53KO + p53^{R273H} y p53KO + p53^{NES} después de 72 horas de tratamiento con erlotinib, nutlina o combinación. **La FIG. 34G** representa datos similares a los de **34F** pero en HK301 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cyto} y p53KO + p53^{wt}. Las concentraciones de fármaco para todos los experimentos son las siguientes: erlotinib (1 μ M), nutlina (2,5 μ M). Las comparaciones se

realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. **La FIG. 34H** representa datos similares a los de **34G** pero en HK336 sgCtrl, p53KO, p53KO + p53^{cyto} y p53KO + p53^{wt}. Las concentraciones de fármaco para todos los experimentos son las siguientes: erlotinib (1 μ M), nutlina (2,5 μ M). Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Las **FIG. 35A-35F** representan que la inhibición del metabolismo de la glucosa en respondedores metabólicos y no respondedores promueven la apoptosis intrínseca. **La FIG. 35A** representa el cambio porcentual, en relación con el control de vehículo, en el cebado según lo determinado por la liberación del citocromo c después de la exposición a péptidos BIM en el respondedor metabólico HK301 después de 24 horas de tratamiento con erlotinib o 2DG. **La FIG. 35B** representa a la izquierda: inmunoprecipitación de p53 en HK301 después de 24 horas de tratamiento con 2DG. El inmunoprecipitado se sondeó con los anticuerpos indicados. A la derecha: lisados respectivos de preinmunoprecipitación (entrada). **La FIG. 35C** representa las mediciones de OCR y ECAR de células HK301 después de la exposición a oligomicina y rotenona. **La FIG. 35D** representa la tinción con anexina V en HK301 después de 72 horas de tratamiento con nutlina, erlotinib, 2DG, oligomicina, rotenona como agentes individuales o en combinación con nutlina. **La FIG. 35E** representa una inmunotransferencia de las proteínas indicadas después de 4 horas de tratamiento con erlotinib o pictilisib en dos no respondedores (HK254 y HK393). **La FIG. 35F** representa la inmunoprecipitación de p53 en HK254 después de 24 horas de tratamiento con pictilisib o 2DG. El inmunoprecipitado se sondeó con los anticuerpos indicados. A continuación se muestran los respectivos lisados de preinmunoprecipitación (entrada). Las concentraciones de fármaco para todos los experimentos son las siguientes: erlotinib (1 μ M), nutlina (2,5 μ M), 2DG (3 mM para HK301 y 1 mM para HK254), oligomicina (1 μ M), rotenona (1 μ M) y pictilisib (1 μ M). Las comparaciones se realizaron mediante el uso de la prueba t de Student no pareada de dos colas. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. **** $p < 0,0001$.

Las **FIG. 36A-36D** representan la eficacia *in vivo* de la inhibición de EGFR y la activación de p53. **La FIG. 36A** representa las concentraciones plasmáticas y cerebrales de idasanutlina en los puntos de tiempo indicados ($n = 2$ ratones/punto de tiempo) en ratones que no portan tumores. **La FIG. 36B** representa el análisis inmunohistoquímico (IHC) de la expresión de p53 en xenoinjertos que portan tumores intracraneales después de 36 horas de tratamiento con idasanutlina (50 mg/kg). **La FIG. 36C** representa el cambio porcentual en la absorción de ¹⁸F-FDG después de 15 horas de tratamiento con erlotinib en xenoinjertos intracraneales GBM39 ($n = 3$) y HK393 ($n = 5$). **La FIG. 36D** representa el cambio en el peso corporal de los ratones después del tratamiento diario con erlotinib (75 mg/kg) o erlotinib combinado (75 mg/kg) e idasanutlina (50 mg/kg). Todos los tratamientos se realizaron por vía oral. Los datos representan los valores medios $\pm$ s.e.m. de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

La FIG. 37A describe que la inhibición directa de la glucólisis con 2DG (inhibidor de hexocinasa) o citocalasina B (un inhibidor del transportador de glucosa) se sinergiza inesperadamente con

la activación de p53 (con nutlina). La **FIG. 37B** representa un nivel bajo de glucosa (0,25 mM) que conduce a la muerte celular sinérgica con la inhibición de BCL-xL con navitoclax (ABT-263). La **FIG. 37C** representa un nivel bajo de glucosa (0,25 mM) que conduce a la muerte celular sinérgica con inhibición de BCL-xL con nutlina.

- 5 **La FIG. 38** muestra una comparación entre respondedores metabólicos al inhibidor de EGFRi, erlotinib y no respondedores metabólicos. La combinación de erlotinib y nutlina conduce a una letalidad sintética sinérgica inesperada en los respondedores metabólicos pero no en los no respondedores.

La FIG. 39A muestra la pureza enantiomérica del intermedio sintético **5** determinada por SFC quiral (columna Chiralpak AD-3, MeOH al 40%). **La FIG. 39B** muestra la pureza enantiomérica del intermedio sintético **(S)-5** determinada por SFC quiral (columna Chiralpak AD-3, MeOH al 40%). **La FIG. 39C** muestra la pureza enantiomérica del intermedio sintético **(R)-5** determinada por SFC quiral (columna Chiralpak AD-3, MeOH al 40%). **La FIG. 39D** muestra la pureza derivados de éster de Mosher **5** determinada por SFC quiral (columna Chiralpak AD-3, MeOH al 40%).

La FIG. 40 representa las actividades de erlotinib, lapatinib, gefitinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra U87 EGFRwt.

La FIG. 41 representa las actividades de erlotinib, lapatinib, gefitinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra U87 EGFRviii.

- 20 **La FIG. 42** representa las actividades de erlotinib, lapatinib, gefitinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra HK301, una gliomasfera de GBM mutante EGFRvIII derivada de un paciente.

La FIG. 43 representa las actividades de erlotinib, lapatinib, gefitinib y compuestos ilustrativos de la descripción contra GBM39, una gliomasfera de GBM mutante EGFRvIII derivada de un paciente.

La FIG. 44 representa las actividades de erlotinib, lapatinib y compuestos ilustrativos de la descripción en un modelo de ratón mutante de GBM39 EGFRvIII.

La FIG. 45A representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción en una línea celular mutante EGFR de cáncer de pulmón HCC827. **La FIG. 45B** representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción en una línea celular mutante EGFR de cáncer de pulmón PC9. **La FIG. 45C** representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción en una línea celular mutante de cáncer de pulmón H838.

La FIG. 46 representa las actividades de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción en un modelo de ratón mutante EGFR de cáncer de pulmón PC9.

La FIG. 47 representa determinados metabolitos de compuestos ilustrativos de la descripción.

La FIG. 48A representa la actividad compuestos ilustrativos de la descripción contra HK301.

La FIG. 48B representa la actividad de compuestos ilustrativos de la descripción contra GBM39.

La FIG. 48C representa la actividad de compuestos ilustrativos de la descripción contra NHA.

40 **La FIG. 49A** representa las características ADME de un compuesto ilustrativo de la descripción en ratas después de la administración PO.

La FIG. 49B representa las características ADME de un compuesto ilustrativo de la descripción

en ratas después de la administración PO.

La FIG. 50A representa las actividades de determinados compuestos de la descripción en comparación con el estándar de atención actual (es decir lapatinib, erlotinib, gefitinib y AZD3759) contra HK301, una gliomasfera de GBM mutante EGFRvIII derivada de un paciente.

5 **La FIG. 50B** representa las actividades de determinados compuestos de la descripción en comparación con el estándar de atención actual (es decir lapatinib, erlotinib, gefitinib y AZD3759) contra HK301, una gliomasfera de GBM mutante EGFRvIII derivada de un paciente.

La FIG. 51A representa las actividades de determinados compuestos de la descripción en comparación con el estándar de atención actual (es decir lapatinib, erlotinib, gefitinib y AZD3759) contra GBM39, una gliomasfera de GBM mutante EGFRvIII derivada de un paciente.

10 **La FIG. 51B** representa las actividades de determinados compuestos de la descripción en comparación con el estándar de atención actual (es decir lapatinib, erlotinib, gefitinib y AZD3759) contra GBM39, una gliomasfera de GBM mutante EGFRvIII derivada de un paciente.

La FIG. 52A representa la actividad de osimertinib y JGK068S contra pEGFRwt. **La FIG. 52B** representa la actividad de osimertinib y JGK068S contra pEGFRvIII.

La FIG. 53A representa la actividad de osimertinib y JGK068S contra HK301. **La FIG. 53B** representa la actividad de osimertinib y JGK068S contra GBM39.

La FIG. 54A representa la actividad de AZD3759, AZD9291 y JGK068S contra certain EGFR mutants. **La FIG. 54B** representa la actividad de AZD3759, AZD9291 y JGK068S contra pEGFR A263P. **La FIG. 54C** representa la actividad de AZD3759, AZD9291 y JGK068S contra pEGFR A289V. **La FIG. 54D** representa la actividad de AZD3759, AZD9291 y JGK068S contra pEGFR A289D. **La FIG. 54E** representa la actividad de AZD3759, AZD9291 y JGK068S contra pEGFR G598V.

25 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Los gliomas son la forma más común de tumor cerebral, y el glioblastoma multiforme (GBM) es la forma más maligna y causa de 3 a 4% de todas las muertes relacionadas con cáncer (Louis et ál. (2007) *Acta. Neuropathol.* 114: 97-109.). La Organización Mundial de la Salud define el GBM como un cáncer de grado IV caracterizado como maligno, mitóticamente activo y predispuesto a la necrosis. El GBM tiene un pronóstico muy desfavorable con una tasa de supervivencia a 5 años de 4 a 5% y la tasa de supervivencia media de GBM es de 12,6 meses (McLendon et ál. (2003) *Cancer.* 98: 1745-1748.). Esto se puede atribuir a las limitaciones únicas del tratamiento, tal como una edad promedio alta de aparición, la ubicación del tumor y una comprensión actual deficiente de la fisiopatología del tumor (Louis et ál. (2007) *Acta. Neuropathol.* 114:97-109). El estándar de atención actual para GBM incluye la resección del tumor con radioterapia y quimioterapia concurrentes y en los últimos años ha habido pocas mejoras marcadas que aumenten las tasas de supervivencia (Stewart, et ál. (2002) *Lancet.* 359:1011-1018.).

40 El estándar para la quimioterapia de GBM es la temozolomida (TMZ), que es un agente alquilante que penetra en el cerebro y que metila las purinas (A o G) en el ADN e induce la apoptosis (Stupp, et ál. (2005) *N. Engl. J. Med.* 352:987-996). Sin embargo, el uso de TMZ tiene inconvenientes en que surge un riesgo significativo del daño del ADN en células sanas y que

las células de GBM pueden desarrollar rápidamente resistencia al fármaco (Carlsson, et ál. (2014) *EMBO. Mol. Med.* 6: 1359-1370). En sí, se requieren con urgencia opciones adicionales de quimioterapia.

El EGFR es un miembro de la superfamilia HER de tirosina cinasas receptoras junto con ERBB2, ERBB3 y ERBB4. Un impulsor común de la evolución de GBM es la amplificación de EGFR, que se encuentra en casi el 40% de todos los casos de GBM (Hynes et ál. (2005) *Nat. Rev. Cancer.* 5: 341-354; Hatanpaa et ál. (2010) *Neoplasia.* 12 :675-684). Además, la amplificación de EGFR se asocia con la presencia de variantes de la proteína de EGFR: en el 68% de los mutantes de EGFR; hay una delección en la región de unión al ligando del extremo N entre los aminoácidos 6 y 273. Estas delecciones en los dominios de unión a ligando de EGFR pueden conducir a la activación de EGFR independiente del ligando (Yamazaki et ál. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 773-779.).

Los inhibidores de tirosina cinasa (TKI) de molécula pequeña son las terapias dirigidas a EGFR clínicamente más avanzadas, y los inhibidores reversibles e irreversibles se encuentran en ensayos clínicos. Los ejemplos de inhibidores reversibles e inhibidores irreversibles incluyen erlotinib, gefitinib, lapatinib, PKI166, canertinib y pelitinib (Mischel et ál. (2003) *Brain Pathol.* 13: 52-61). Mecánicamente, estos TKI compiten con ATP por unirse al dominio de tirosina cinasa de EGFR; sin embargo, estos inhibidores de tirosina cinasa específicos de EGFR han sido relativamente ineficaces contra los gliomas, con tasas de respuesta que solo alcanzan el 25% en el caso de erlotinib (Mischel et ál. (2003) *Brain Pathol.* 13: 52-61; Gan et ál. (2009) *J. Clin. Neurosci.* 16: 748-54). Si bien los inhibidores de tirosina cinasa son bien tolerados y muestran cierta actividad antitumoral en pacientes con GBM, el problema recurrente de la resistencia a la inhibición del receptor limita su eficacia (Learn et ál. (2004) *Clin. Cancer. Res.* 10: 3216-3224; Rich et ál. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 430-446). Además, estudios recientes han demostrado que las concentraciones plasmáticas cerebrales de gefitinib y erlotinib después del tratamiento fueron solo de 6–11% de la dosis inicial, lo que sugiere que estos compuestos pueden fallar en cruzar la barrera hematoencefálica tal como se ilustra en la tabla 1 (Karpel-Massler et ál. (2009) *Mol. Cancer Res.* 7: 1000-1012). Por lo tanto, la administración insuficiente al objetivo puede ser otra causa de los resultados clínicos decepcionantes.

Tabla 1: tasas de penetración cerebral de los fármacos de estándar de atención actual

Compuesto	Primario	Dosis diaria	Plasma (ng/ml)	CSF (ng/ml)	Tasa de penetración cerebral (%)
Afatinib	NSCLC mutante de EGFR	50	66,7	0,46	0,7
Alectinib	NSCLC mutante de ALK	1200	1,5 (conc. sin unir)	1,3	86,7
Crizotinib	NSCLC	500	237	0,616	0,26

	mutante de ALK				
Erlotinib	NSCLC	150	1140 ± 937	28,7 ± 16,8	2,77±0,45
	mutante de EGFR NSCLC mutante de EGFR	1500 (semanal)	4445,9	51,1	1,2
Gefitinib	NSCLC	250	326 ± 116	3,7 ± 1,9	1,13±0,36
	mutante de EGFR NSCLC mutante de EGFR	750-1000	1345,9- 5094,4	14,7-143,1	1,07-3,58
Lapatinib	HER2 + cáncer de mama	1250	1515, 3472	1,3, 4,5	0,09, 0,13

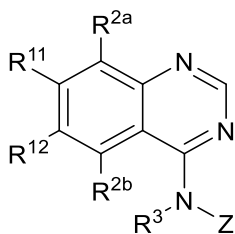
A la luz de esta evidencia, sigue existiendo una necesidad clínica insatisfecha de potentes inhibidores de tirosina cinasa que tengan la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y tratar la inhibición de EGFR y sus isoformas.

Además, los inventores han demostrado que la interferencia entre la señalización oncogénica y las vías metabólicas crea oportunidades para nuevas terapias de combinación en GBM. Más específicamente, los inventores han descubierto que la inhibición aguda de la absorción de glucosa impulsada por EGFR induce una muerte celular mínima, aunque reduce el umbral apoptótico en las células de GBM derivadas del paciente y “ceba” las células para la apoptosis. Inesperadamente, los estudios mecanicistas de los inventores revelaron que Bcl-xL bloquea p53 citoplasmática para que no provoque la apoptosis intrínseca, lo que conduce a la supervivencia del tumor. La estabilización farmacológica de p53 (tal como, por ejemplo, con la molécula pequeña que penetra en el cerebro, idasanutlina) permite que p53 active la maquinaria apoptótica intrínseca, mediante lo cual se promueve la letalidad sinérgica con la absorción de glucosa dirigida por EGFR en xenoinjertos de GBM. En particular, los inventores también descubrieron que los cambios rápidos en la absorción de ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (¹⁸F-FDG) mediante el uso de, por ejemplo, tomografía por emisión de positrones no invasiva podrían predecir la sensibilidad a la combinación *in vivo*.

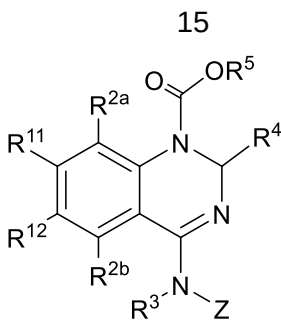
Los inventores, entre otras cosas, identifican un vínculo crítico entre la señalización oncogénica, el metabolismo de glucosa y p53 citoplasmática, que podría aprovecharse para la terapia de combinación en GBM y otras neoplasias malignas.

Compuestos de la descripción

En un aspecto, la presente descripción proporciona compuestos de la Fórmula I o la Fórmula I*:



(I)



(I*)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

Z es arilo o heteroarilo;

- 5 cada uno de R^{2a} y R^{2b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, halo, CN y NO₂;
R³ es hidrógeno, alquilo o acilo;

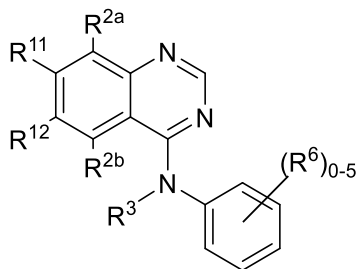
R⁴ es alcoxi;

R⁵ es alquilo; cada uno de R⁷ y R⁸ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, tal como alcoxialquilo, aralquilo o arilacilo;

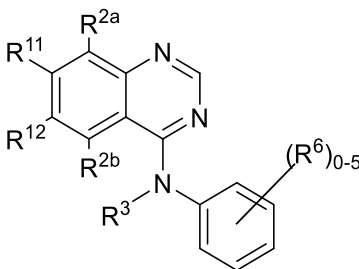
- 10 R¹¹ es hidrógeno, alquilo, halo, CN, NO₂, OR⁷, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo; y
R¹² es hidrógeno, alquilo, halo, CN, NO₂, OR⁸, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo; o
R¹¹ y R¹² tomados juntos completan un anillo carbocíclico o heterocíclico.

En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula I o la Fórmula I*, al menos uno de R^{2a} y R^{2b} no es H. En determinadas modalidades de la Fórmula I o la Fórmula I*, si R^{2a} es hidrógeno,
15 entonces R^{2b} se selecciona de alquilo, halo, CN y NO₂. En otras de tales modalidades de la Fórmula I o la Fórmula I*, si R^{2b} es hidrógeno, entonces R^{2a} se selecciona de alquilo, halo, CN, y NO₂.

En determinadas modalidades de la Fórmula I o la Fórmula I*, el compuesto es un compuesto de la Fórmula (IVa) o Fórmula (IVb):



(IVa)



(IVb)

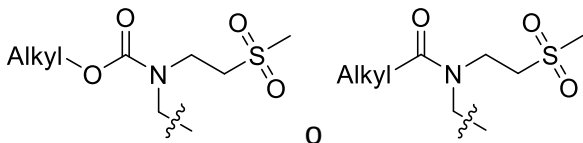
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde

cada instancia de R⁶ se selecciona independientemente de alquilo, alcoxi, OH, CN, NO₂, halo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo.

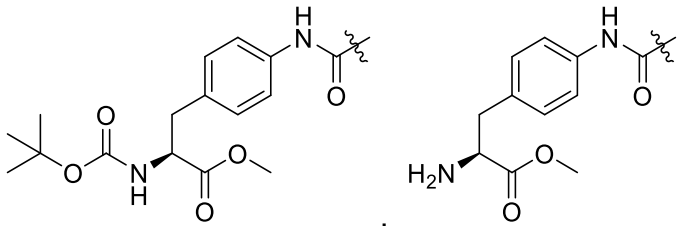
- 25 En determinadas modalidades de la Fórmula I, I*, Iva, y IVb, R¹¹ es hidrógeno. En otras modalidades preferidas, R¹¹ es OR⁷.

En determinadas modalidades de la Fórmula I, I*, Iva, y IVb, R⁷ es hidrógeno. En otras modalidades, R⁷ es alquilo. En aun otras modalidades, R⁷ es alcoxialquilo. En aun otras modalidades, R⁷ es arilacilo.

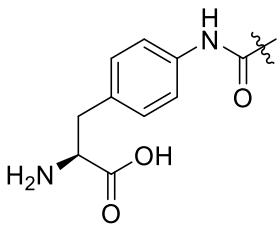
- 30 En determinadas modalidades de la Fórmula I, I*, Iva, y IVb, R¹² es heteroarilo, tal como furanilo. En determinadas modalidades, el heteroarilo está sustituido con alquilo, alcoxi, OH, CN, NO₂,



halo, . En otras modalidades preferidas, R¹² es OR⁸. En determinadas modalidades de la Fórmula I, I*, Iva, y IVb, R⁸ es hidrógeno. En otras modalidades, R⁸ es alquilo. En aun otras modalidades, R⁸ es alcoxialquilo. En determinadas



modalidades, R⁸ es alquilo sustituido con , o

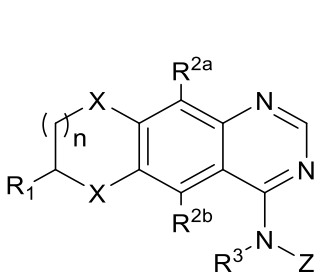


5

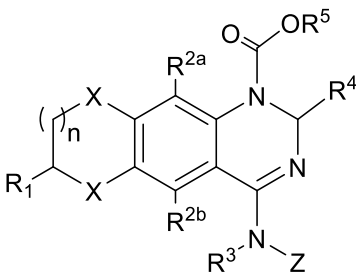
En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula I, I*, Iva y IVb, R¹¹ y R¹² se combinan para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico, tal como un anillo carbocíclico o heterocíclico de 5 miembros, 6 miembros o 7 miembros. En determinadas modalidades, el anillo carbocíclico o heterocíclico está sustituido con hidroxilo, alquilo (por ejemplo, metilo) o alquenilo (por ejemplo, vinilo).

10

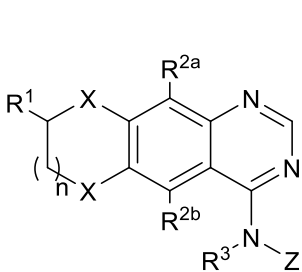
En determinadas modalidades de la Fórmula I, I*, Iva y IVb, el compuesto es un compuesto de la Fórmula Ia, Ib, Ic o Id:



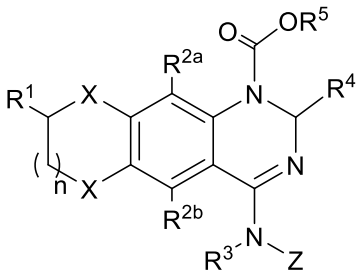
(Ia)



(Ib)



(Ic)



(Id)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

X es O, S o NH;

Z es arilo o heteroarilo;

R¹ es hidrógeno o alquilo;

cada uno de R^{2a} y R^{2b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, halo, CN y NO₂;

R³ es hidrógeno, alquilo o acilo;

R⁴ es alcoxi;

20

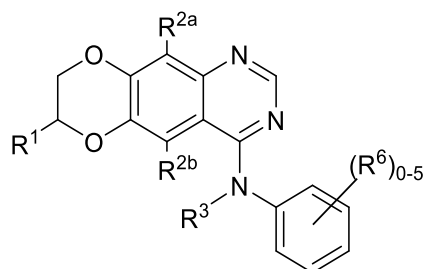
R^5 es alquilo y

n es 0-3.

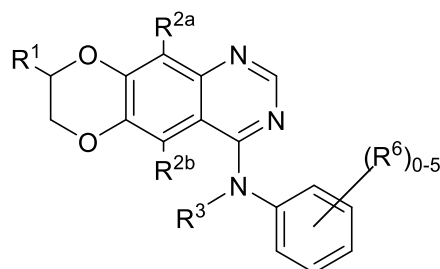
En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic o Id, uno de R^{2a} o R^{2b} se selecciona de alquilo, halo, CN, y NO_2 . En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula Ia, Ib, Ic o Id,

5 Z es fenilo. En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula Ia, Ib, Ic o Id, X es O. En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula Ia, Ib, Ic o Id, n es 1.

En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic o Id, el compuesto es un compuesto de la Fórmula (IIa) o la Fórmula (IIb):



10 (IIa)

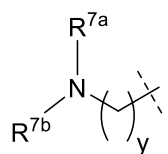


(IIb)

o una sal farmacéuticamente aceptable, donde

cada instancia de R^6 se selecciona independientemente de alquilo, alcoxi, OH, CN, NO_2 , halo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo.

En determinadas modalidades, donde R^1 está representado por la Fórmula A:



15

(A)

donde,

cada uno de R^{7a} y R^{7b} se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo; o R^{7a} y R^{7b} se combinan para formar un

20 heterociclilo; e

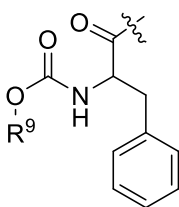
y es 0-3

En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula IIa o IIb, R^1 es alquilo (por ejemplo, metilo o etilo). En determinadas modalidades, R^1 está sustituido con heterociclilo (por ejemplo, morfolinilo, piperidinilo, pirrolodinilo o piperazinilo, tal como N-metil piperazinilo). En otras modalidades, R^1 está sustituido con amino (por ejemplo, dimetil amino). En otras modalidades, R^1 es alquilo sustituido con hidroxilo. En determinadas modalidades preferidas, R^1 está en la configuración S. En otras modalidades, R^1 está en la configuración R.

25

En determinadas modalidades preferidas de la Fórmula IIa o IIb, R^3 es hidrógeno. En otras modalidades, R^3 es acilo. En determinadas modalidades, R^3 es alquilacilo. En determinadas modalidades, R^3 es alquiloacilo. En determinadas modalidades, R^3 es aciloxiacilo. En

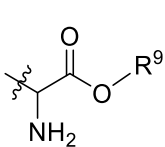
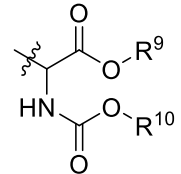
30



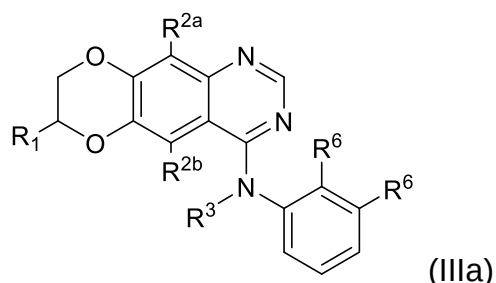
determinadas modalidades, R^3 es ; y R^9 es alquilo.

En determinadas modalidades de la Fórmula IIa o IIb, Z es arilo o heteroarilo sustituido

opcionalmente con uno o más R^6 ; y cada instancia de R^6 se selecciona independientemente de alquilo, alcoxi, OH, CN, NO_2 , halo, alquenilo, alquinilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo. En determinadas modalidades preferidas, Z es fenilo sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 R^6 . En determinadas modalidades, cada R^6 se selecciona independientemente de halo, alquilo, alquinilo o arilalcoxi. En modalidades más preferidas, Z es 2-fluoro-3-clorofenilo, 2-fluorofenilo, 2,3-difluorofenilo, 2,4-difluorofenilo, 2,5-difluorofenilo, 2,6-difluorofenilo, 2,4,6-trifluorofenilo, pentafluorofenilo, 2-fluoro-3-bromofenilo, 2-fluoro-3-etinilfenilo y 2-fluoro-3-(trifluorometil)fenilo. En otras modalidades incluso más preferidas, Z es 3-etinilfenilo. En otras modalidades más preferidas, Z es 3-cloro-4-((3-fluorobencil)oxi)benceno. En otras modalidades más preferidas, Z es 3-cloro-2-(trifluorometil)fenil. En otras modalidades incluso más preferidas, Z es 3-bromofenilo. En otras modalidades incluso más preferidas, Z es 2-fluoro,5-bromofenilo. En otras modalidades incluso más preferidas, Z es 2,6-difluoro,5-bromofenilo. En determinadas

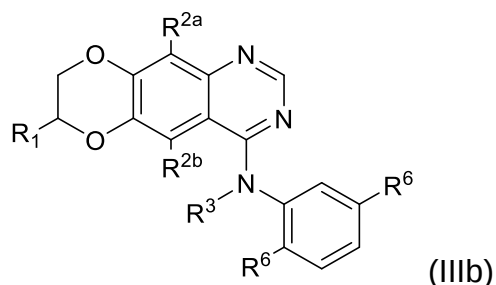
modalidades, Z está sustituido con R^6 seleccionado de  o ; y R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente de alquilo.

En determinadas modalidades de la Fórmula IIIa o IIIb, el compuesto es un compuesto de la Fórmula (IIIa):



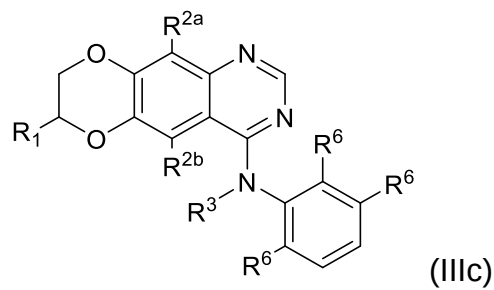
y cada R^6 se selecciona independientemente de fluoro, cloro o bromo.

En determinadas modalidades de la Fórmula IIIa o IIIb, el compuesto es un compuesto de la Fórmula (IIIb):



y cada R^6 se selecciona independientemente de fluoro, cloro o bromo.

En determinadas modalidades de la Fórmula IIIa o IIIb, el compuesto es un compuesto de la Fórmula (IIIc):

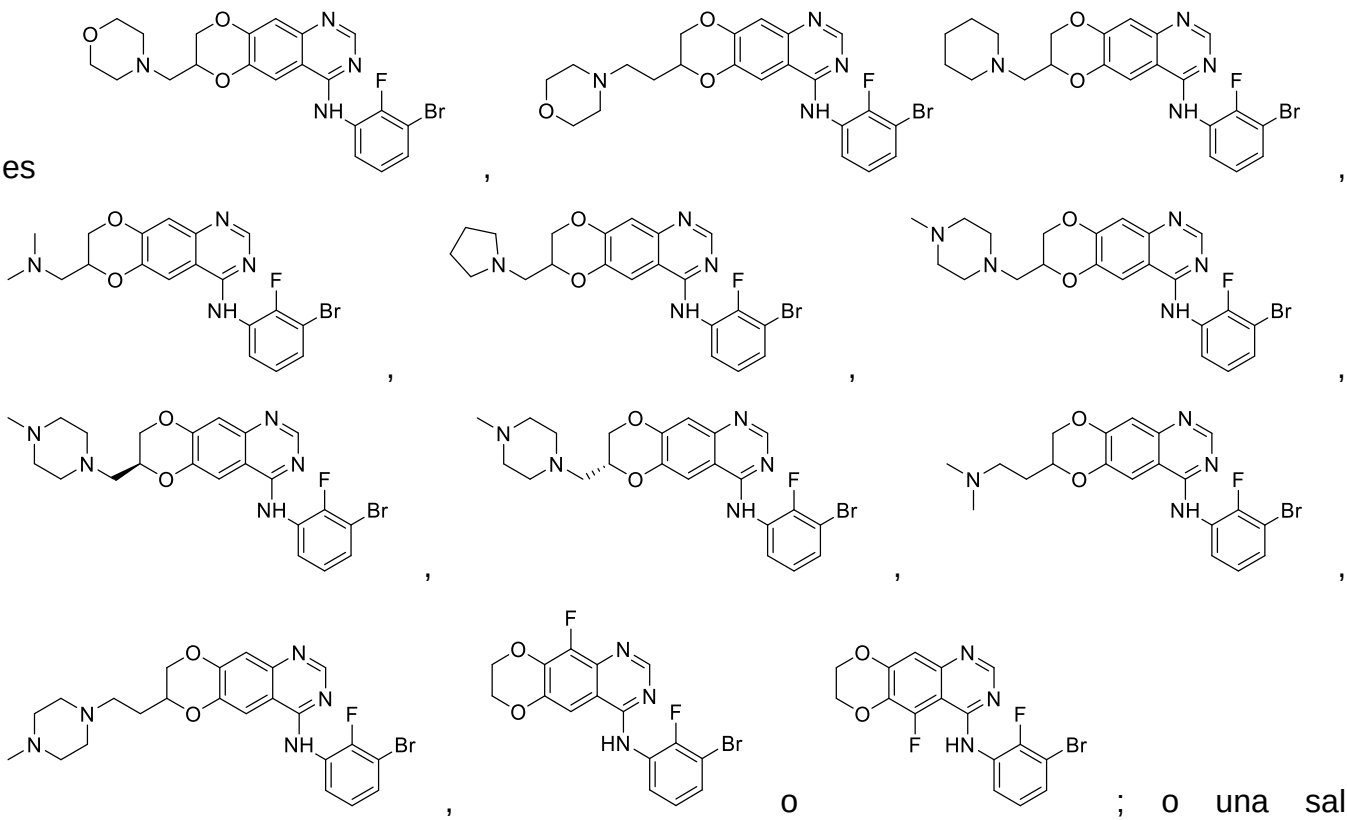


y cada R⁶ se selecciona independientemente de fluoro, cloro o bromo.

En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb o IIIc, R^{2a} es halo (por ejemplo, fluoro). En otras modalidades preferidas, R^{2a} es hidrógeno.

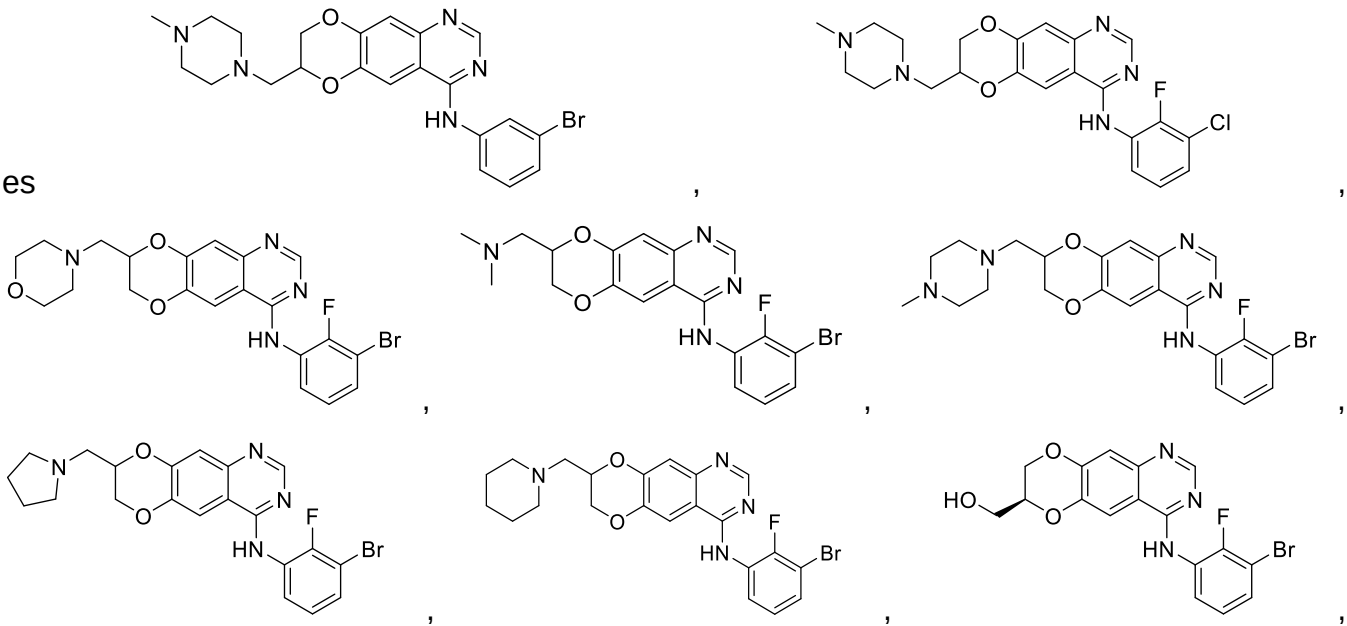
5 En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb o IIIc, R^{2b} es halo (por ejemplo, fluoro). En otras modalidades preferidas, R^{2b} es hidrógeno.

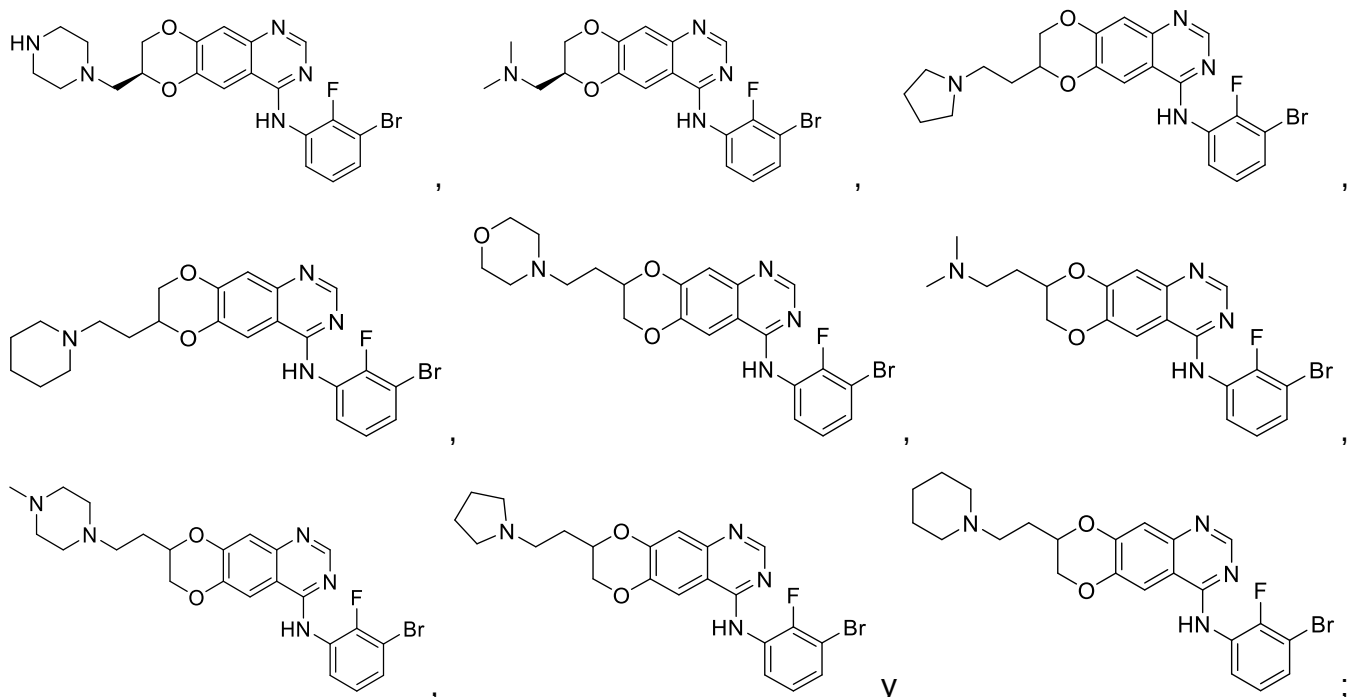
En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb o IIIc, el compuesto



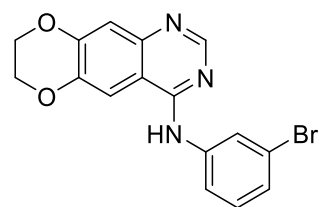
farmacéuticamente aceptable de este.

En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb o IIIc, el compuesto

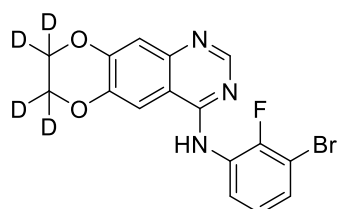




o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

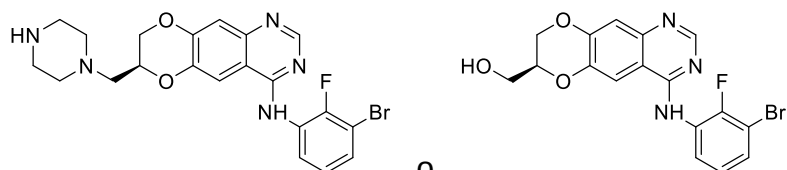


5 En determinadas modalidades de la Fórmula I, el compuesto es



; o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En determinadas modalidades de la Fórmula Ia, Ib, Ic, Id, IIa, IIb, IIIa, IIIb o IIIc, el compuesto



es o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 Métodos de tratamiento

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona métodos para inhibir EGFR o ΔEGFR, que comprenden administrarle a un sujeto una cantidad de un compuesto de la descripción.

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar el cáncer que comprenden administrarle a un sujeto que necesite un tratamiento para el cáncer una cantidad de un compuesto de la descripción. En determinadas modalidades, el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de corazón, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, fibrosarcoma, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de cabeza, columna y cuello, sarcoma de Kaposi, 15 cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, linfoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de células germinales testicular, carcinoma timoma, carcinoma tímico, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de próstata. En determinadas 20

modalidades, el cáncer es glioma, astrocitoma o glioblastoma. En determinadas modalidades, el cáncer es glioblastoma. En determinadas modalidades, el cáncer es glioblastoma multiforme. En determinadas modalidades, el método reduce la proliferación de células cancerosas.

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar el cáncer

5 en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto un inhibidor del metabolismo de la glucosa y un agente adicional, donde el metabolismo de la glucosa es un compuesto de la descripción o una sal farmacéuticamente aceptable de este y el agente adicional es un estabilizador de p53 citoplasmática. En determinadas modalidades, el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de corazón, cáncer de
10 cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, fibrosarcoma, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de cabeza, columna y cuello, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, linfoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de células germinales testicular, carcinoma timoma, carcinoma tímico, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de próstata. En determinadas
15 modalidades, el cáncer es glioma, astrocitoma o glioblastoma. En determinadas modalidades, el cáncer es glioblastoma. En determinadas modalidades, el cáncer es glioblastoma multiforme. En determinadas modalidades, el método reduce la proliferación de células cancerosas. En determinadas modalidades, el cáncer es recidivante o refractario. En otras modalidades, el cáncer no ha recibido tratamiento previo.

20 En determinadas modalidades, se ha determinado que el sujeto es susceptible al inhibidor del metabolismo de la glucosa mediante un método que comprende:

- a. obtener una primera muestra de sangre del sujeto;
- b. colocar al sujeto en una dieta cetogénica;
- c. obtener una segunda muestra de sangre del sujeto después de someterse a una dieta
25 cetogénica durante un período de tiempo;
- d. medir el nivel de glucosa en la primera y segunda muestra de sangre;
- e. comparar el nivel de glucosa en la segunda muestra de sangre con el nivel de glucosa en la primera muestra de sangre; y

f. determinar que el sujeto es susceptible si el nivel de glucosa en la segunda muestra de
30 sangre se reduce en comparación con los niveles de glucosa en la primera muestra de sangre. En determinadas modalidades, la reducción del nivel de glucosa entre la segunda muestra de sangre y la muestra de sangre de control es de alrededor de 0,15 mM o más. En determinadas modalidades, la reducción del nivel de glucosa entre la segunda muestra de sangre y la muestra de sangre de control es de alrededor de 0,20 mM o más. En determinadas modalidades, la
35 reducción del nivel de glucosa entre la segunda muestra de sangre y la muestra de sangre de control se encuentra en el intervalo de 0,15 mM - 2,0 mM. En determinadas modalidades, la reducción del nivel de glucosa entre la segunda muestra de sangre y la muestra de sangre de control se encuentra en el intervalo de 0,25 mM - 1,0 mM.

En determinadas modalidades, el estabilizador de p53 citoplasmática es un inhibidor de MDM2.

40 En determinadas modalidades, el inhibidor de MDM2 es una nutlina. En determinadas modalidades, el inhibidor de MDM2 es nutlin-3 o idasanutlina. En determinadas modalidades, al sujeto se le administran de 50 mg a 1600 mg de idasanutlina. En determinadas modalidades,

al sujeto se le administran 100 mg de idasanutlina. En determinadas modalidades, al sujeto se le administran 150 mg de idasanutlina. En determinadas modalidades, al sujeto se le administran 300 mg de idasanutlina. En determinadas modalidades, al sujeto se le administran 400 mg de idasanutlina. En determinadas modalidades, al sujeto se le administran 600 mg de idasanutlina. En determinadas modalidades, al sujeto se le administran 1600 mg de idasanutlina. En otras modalidades, el inhibidor de MDM2 es RO5045337, RO5503781, RO6839921, SAR405838, DS-3032, DS-3032b o AMG-232.

En determinadas modalidades, el estabilizador de p53 citoplasmática es un inhibidor de BCL-2. En determinadas modalidades, el inhibidor de BCL-2 es oligodesoxinucleótido antisentido G3139, antagonista de ARNm SPC2996, venetoclax (ABT-199), GDC-0199, obatoclax, paclitaxel, navitoclax (ABT-263), ABT-737, NU-0129, S 055746 o APG-1252.

En determinadas modalidades, el estabilizador de p53 citoplasmática es un inhibidor de Bcl-xL. En determinadas modalidades, el inhibidor de Bcl-xL es WEHI 539, ABT-263, ABT-199, ABT-737, sabutoclax, AT101, TW-37, APG-1252 o ácido gambógico.

En determinadas modalidades, el inhibidor del metabolismo de la glucosa y el estabilizador de p53 citoplasmática se administran en la misma composición. En otras modalidades, el inhibidor del metabolismo de la glucosa y el estabilizador de p53 citoplasmática se administran composiciones separadas.

En determinadas modalidades, el método comprende además la administración de una terapia adicional.

Tipos y etapas de gliomas

Los tumores cerebrales malignos primarios son tumores que comienzan en el cerebro o la columna y se conocen colectivamente como gliomas. Los gliomas no son un tipo específico de cáncer, pero son un término que se usa para describir los tumores que se originan en las células gliales. Los ejemplos de tumores cerebrales malignos primarios incluyen astrocitomas, astrocitomas pilocíticos, xantoastrocitomas pleomórficos, astrocitomas difusos, astrocitomas anaplásicos, GBM, gangliogliomas, oligodendrogliomas, ependimomas. Según la clasificación de la OMS de tumores cerebrales, los astrocitomas se han clasificado en cuatro grados, determinados por la patología subyacente. Las características que se utilizan para clasificar los gliomas incluyen mitosis, atipia celular o nuclear y proliferación y necrosis vascular con características pseudopalisadas. Los gliomas malignos (o de grado alto) incluyen glioma anaplásico (grado III de la OMS) y glioblastoma multiforme (GBM; grado IV de la OMS). Estos son los tumores cerebrales más agresivos y con peor pronóstico.

El GBM es el tipo de cáncer cerebral más común, complejo, resistente al tratamiento y más mortal, y representa el 45% de todos los cánceres cerebrales, con casi 11 000 hombres, mujeres y niños diagnosticados cada año. Los GBM (también conocidos como astrocitoma de grado 4 y glioblastoma multiforme) son los tipos más comunes de tumores cerebrales primarios malignos (cancerosos). Son extremadamente agresivos por varias razones. Primero, las células del glioblastoma se multiplican rápidamente, ya que secretan sustancias que estimulan un abundante suministro de sangre. También tienen la capacidad de invadir e infiltrarse a largas distancias en el cerebro normal enviando zarcillos microscópicos de tumor junto con las células normales. Se conocen dos tipos de glioblastomas. Los GBM primarios son la forma más común;

crecen rápidamente y a menudo causan síntomas temprano. Los glioblastomas secundarios son menos comunes y representan alrededor del 10 por ciento de todos los GBM. Progresan desde un astrocitoma difuso de grado bajo o un astrocitoma anaplásico y se encuentran con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes. Los GBM secundarios se localizan preferentemente en el lóbulo frontal y tienen un mejor pronóstico.

El GBM generalmente se trata mediante un plan de tratamiento multimodal combinado que incluye la extirpación quirúrgica del tumor, radiación y quimioterapia. Primero, se extrae la mayor cantidad de tumor posible durante la cirugía. La ubicación del tumor en el cerebro a menudo determina cuánto se puede extirpar de manera segura. Después de la cirugía, la radiación y la quimioterapia retardan el crecimiento de las células tumorales restantes. El fármaco de quimioterapia oral, temozolomida, se usa con mayor frecuencia durante seis semanas y luego mensualmente. Otro medicamento, bevacizumab (conocido como Avastin®), también se usa durante el tratamiento. Este fármaco ataca la capacidad del tumor para reclutar suministro de sangre, a menudo ralentizando o incluso deteniendo el crecimiento del tumor.

También se utilizan nuevos tratamientos en investigación y estos pueden implicar agregar tratamientos a la terapia estándar o reemplazar una parte de la terapia estándar con un tratamiento diferente que puede funcionar mejor. Algunos de estos tratamientos incluyen inmunoterapia, tales como inmunoterapias con vacunas, o pulsos eléctricos de baja dosis en el área del cerebro donde existe el tumor y nanoterapias que involucran ácidos nucleicos esféricos (ANE) tal como NU-0129. En algunas modalidades, los métodos de la descripción actual se usan en combinación con una o más de las terapias mencionadas anteriormente.

También se contempla que las modalidades de los métodos y composiciones discutidas en la presente sean aplicables a otros tipos de cánceres, que incluyen, de modo no taxativo, cáncer de pulmón, cánceres que no son del SNC, cánceres del SNC y metástasis en el SNC, tales como metástasis cerebrales, metástasis leptomeníngeas, metástasis coroideas, metástasis de la médula espinal y otras.

Estabilizadores de p53 citoplasmática

Los inventores han demostrado que la estabilización farmacológica de p53, tal como con una molécula pequeña que penetra en el SNC, por ejemplo, era sinérgicamente letal con la inhibición de la absorción de glucosa impulsada por EGFR en modelos de GBM primarios derivados del paciente. Los inventores han demostrado, por primera vez, que las funciones no transcripcionales de p53 pueden tener un papel crítico en la estimulación de la apoptosis intrínseca en respondedores metabólicos. Por consiguiente, los métodos de tratamiento descritos en la presente comprenden la administración de estabilizadores de p53 citoplasmática en combinación con inhibidores del metabolismo de la glucosa. Los estabilizadores de p53 citoplasmática e inhibidores del metabolismo de la glucosa pueden administrarse en la misma composición o en composiciones diferentes, de forma cocomitante o secuencial. Se contempla que en algunas modalidades se usa un solo estabilizador de p53 y en otras modalidades se usa más estabilizador de p53. Por ejemplo, se informa que la combinación de nutlina con ABT 737 (que se une a BCL-2 y BCL-X_L) se dirige sinérgicamente al equilibrio de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas a nivel mitocondrial, mediante lo cual se promueve la muerte celular (Hoe et ál. 2014. Nature Reviews. Vol. 13. pp. 217). Como se pretende en la presente,

un estabilizador de p53 citoplasmática es cualquier molécula pequeña, anticuerpo, péptido, proteína, ácido nucleico o derivados de estos que pueden estabilizar o activar farmacológicamente p53 de forma directa o indirecta. La estabilización de p53 citoplasmática conduce al cebado de células, tales como las células cancerosas, para la apoptosis.

5 Antagonistas de MDM2

Los niveles de proteína p53 dentro de las células están estrictamente controlados y se mantienen bajos por su regulador negativo, la proteína ligasa de ubiquitina E3 MDM2. En modalidades de los métodos o composición de la descripción actual, el estabilizador de p53 citoplasmática es un antagonista/inhibidor de MDM2. En algunas modalidades, el antagonista de MDM2 es nutlina. En modalidades adicionales, la nutlina es nutlina-3 o idasanutlina. En otras modalidades, el ag de MDM2 es RO5045337 (también conocido como RG7112), RO5503781, RO6839921, SAR405838 (también conocido como MI-773), DS-3032, DS-3032b o AMG-232 o cualquier otro inhibidor de MDM2.

Otros compuestos dentro del alcance de los métodos actuales que se sabe que se unen a MDM-2 incluyen Ro-2443, MI-219, MI-713, MI-888, DS-3032b, benzodiazepinadionas (por ejemplo, TDP521252), sulfonamides (por ejemplo, NSC279287), cromenotriazolopirimidina, morfolinona y piperidinonas (AM-8553), terfenilos, chalconas, pirazoles, imidazoles, imidazol-indoles, isoindolinona, pirrolidinona (por ejemplo, PXN822), priaxon, piperidinas, xantonas preniladas derivadas de forma natural, SAH-8 (péptidos grapados) sMTide-02, sMTide-02a (péptidos grapados), ATSP-7041 (péptido grapado), espiroligómero (mimético de α -hélice). Otros compuestos que se sabe que causan el pliegue de proteínas de MDM2 incluyen PRIMA-1MET (también conocido como APR-246) Aprea 102-105, PK083, PK5174, PK5196, PK7088, benzotiazoles, ácido estíctico y NSC319726.

Inhibidores de BCL-2

En modalidades adicionales de los métodos o composiciones actuales, el estabilizador de p53 citoplasmática es un inhibidor de BCL-2. En algunas modalidades, el inhibidor de BCL-2 es, por ejemplo, oligodesoxinucleótido antisentido G3139, antagonista de ARNm SPC2996, venetoclax (ABT-199), GDC-0199, obatoclax, paclitaxel, navitoclax (ABT-263), ABT-737, NU-0129, S 055746, APG-1252 o cualquier otro inhibidor de BCL-2.

30 *Inhibidores de Bcl-xL*

En otras modalidades adicionales de los métodos o composiciones actuales, el estabilizador de p53 citoplasmática es un inhibidor de Bcl-xL. En algunas modalidades, el inhibidor de Bcl-xL es, por ejemplo, WEHI 539, ABT-263, ABT-199, ABT-737, sabutoclax, AT101, TW-37, APG-1252, ácido gambógico o cualquier otro inhibidor de Bcl-xL.

35 Métodos de evaluación

Pruebas de absorción de glucosa

En modalidades de los métodos y composiciones de la descripción actual, el sujeto con GBM o cáncer se clasifica como un “respondedor metabólico” o un “no respondedor metabólico”, es decir, se determinó que es susceptible a los inhibidores del metabolismo de la glucosa. En determinadas modalidades, la clasificación del sujeto es antes de administrarle un tratamiento que comprende un inhibidor del metabolismo de la glucosa y un estabilizador de p53

citoplasmática. Por consiguiente, la descripción actual proporciona métodos para evaluar un cáncer, clasificar a un sujeto, determinar la susceptibilidad de un sujeto a los tratamientos que implican el análisis del metabolismo de la glucosa, la glucólisis o la absorción de glucosa. Los métodos para clasificar a un sujeto como respondedor metabólico se describen en detalle en el

5 Ejemplo 1. Se proporcionan técnicas para controlar la glucólisis y la absorción de glucosa en T. TeSlaa y M.A. Teitell. 2014. *Methods in Enzymology*, volumen 542, pp. 92-114, que se incorpora a la presente mediante esta referencia.

La glucólisis es la conversión bioquímica intracelular de una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato con la generación simultánea de dos moléculas de ATP. El piruvato es

10 un intermedio metabólico con varios destinos potenciales, incluida la entrada en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) dentro de las mitocondrias para producir NADH y FADH₂. De manera alternativa, el piruvato se puede convertir en lactato en el citosol mediante la lactato deshidrogenasa con la regeneración concurrente de NAD⁺ a partir de NADH. Un aumento del flujo a través de la glucólisis apoya la proliferación de células cancerosas al proporcionar, por

15 ejemplo, energía adicional en forma de ATP, así como intermedios metabólicos derivados de la glucosa para la biosíntesis de nucleótidos, lípidos y proteínas. Warburg (*Oncologia*. 1956;9(2):75-83) observó por primera vez que la proliferación de células tumorales aumenta la glucólisis aeróbica, la conversión de glucosa en lactato en presencia de oxígeno, en contraste con las células no malignas que respiran principalmente cuando hay oxígeno disponible. Este

20 bypass mitocondrial, llamado efecto Warburg, ocurre en células que proliferan rápidamente, incluidas las células cancerosas, los linfocitos activados y las células madre pluripotentes. El efecto Warburg se ha aprovechado para pruebas de diagnóstico clínico que utilizan la tomografía por emisión de positrones (PET) para identificar una mayor absorción celular de análogos de glucosa fluorada como la ¹⁸F-desoxiglucosa.

Por lo tanto, la glucólisis representa un objetivo para los métodos terapéuticos y de diagnóstico. En el contexto de los métodos actuales, la medición de la absorción de glucosa y la excreción de lactato por las células malignas puede ser útil para detectar cambios en el catabolismo de la glucosa y/o susceptibilidad a los inhibidores del metabolismo de la glucosa. La detección de tales cambios es importante para los métodos de tratamiento de GBM, los métodos para reducir

30 el riesgo de una terapia ineficaz, los métodos para reducir las posibilidades de supervivencia del tumor. Para los fines de la presente descripción, la PET con ¹⁸F-desoxiglucosa sirve en determinadas modalidades como un biomarcador funcional rápido no invasivo para predecir la sensibilidad a la activación de p53. Este análisis no invasivo podría ser particularmente valioso para los tumores cerebrales malignos, donde la evaluación farmacocinética/farmacodinámica

35 es extremadamente difícil y poco práctica. En algunos casos, los protocolos de imagenología retardados (41) y los mapas de respuesta paramétrica (PRM) con fusión de MRI pueden ser útiles para cuantificar los cambios en la absorción de ¹⁸F-FDG en tumor (42).

En determinados aspectos, los métodos pueden relacionarse con la medición de la absorción de glucosa y la producción de lactato. Para las células en cultivo, el flujo glucolítico se puede

40 cuantificar al medir la absorción de glucosa y la excreción de lactato. La absorción de glucosa en la célula se realiza a través de transportadores de glucosa (Glut1-Glut4), mientras que la excreción de lactato se realiza a través de transportadores de monocarboxilato (MCT1-MCT4)

en la membrana celular.

Glucosa y lactato extracelulares

Los métodos para detectar la absorción de glucosa y la excreción de lactato incluyen, por ejemplo, kit de lactato o glucosa extracelular, bioanalizador extracelular, medición de ECAR, absorción de [3H]-2-DG o [14C]-2-DG, absorción de ¹⁸F-DG o absorción de 2-NBDG.

Hay disponibles comercialmente kits e instrumentos para cuantificar los niveles de glucosa y lactato dentro de los medios de cultivo celular. Los métodos de detección del kit suelen ser colorimétricos o fluorométricos y son compatibles con el equipo de laboratorio estándar, tales como los espectrofotómetros. Los analizadores BioProfile (tal como Nova Biomedical) o los analizadores bioquímicos (tal como, por ejemplo, YSI Life Sciences) pueden medir los niveles de glucosa y lactato en medios de cultivo celular. GlucCell (Cesco BioProducts) solo puede medir los niveles de glucosa en medios de cultivo celular. Si bien cada método comercial tiene un protocolo de detección diferente, la recolección de medios de cultivo para análisis es la misma.

Tasa de acidificación extracelular

La glucólisis también se puede determinar mediante mediciones de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) del medio circundante, que es predominantemente de la excreción de ácido láctico por unidad de tiempo después de su conversión a piruvato. El analizador de flujo extracelular (XF) Seahorse (Seahorse Bioscience) es una herramienta para medir la glucólisis y la fosforilación oxidativa (a través del consumo de oxígeno) simultáneamente en las mismas células.

Absorción de análogos de glucosa

Determinadas modalidades de los métodos de la descripción actual incluyen el uso de análogos de glucosa. Como sería familiar para un experto en la técnica, para determinar la tasa de absorción de glucosa por las células, se puede agregar una isoforma de glucosa marcada al medio de cultivo celular y luego medir dentro de las células después de un período de tiempo dado. Los tipos ilustrativos de análogos de glucosa para estos estudios incluyen, entre otros, análogos de glucosa radiactivos, tales como 2-desoxi-D-[1,2-3H]-glucosa, 2-desoxi-D-[1-14C]-glucosa o 2-desoxi-2-(¹⁸F)-fluoro-D-glucosa (¹⁸F-DG), o análogos de glucosa fluorescentes, tales como 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-dioxol-4-il)amino]-2-desoxiglucosa (2-NBDG). Las mediciones de la absorción de análogos de glucosa radiactiva requieren un contador de centelleo, mientras que la absorción de 2-NBDG suele medirse mediante citometría de flujo o microscopía fluorescente. En algunas modalidades, la absorción de glucosa se mide mediante la absorción de glucosa radiomarcada 2-desoxi-2-[flúor-18]fluoro-D-glucosa (¹⁸F-FDG). En modalidades adicionales, la detección de ¹⁸F-FDG se realiza mediante tomografía por emisión de positrones (PET). En algunas modalidades, la biopsia se toma de un tumor de GBM. En los ejemplos siguientes se proporciona una descripción detallada de un ejemplo de medición de ¹⁸F-FDG.

En determinados aspectos, los métodos pueden relacionarse con la comparación de la absorción de glucosa de una muestra biológica, tal como una muestra de tumor, con un control. Los aumentos o disminuciones de proporción pueden ser, ser al menos o ser como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65,

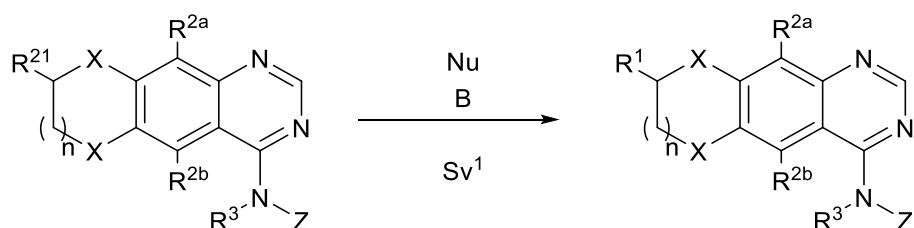
15

Se pueden utilizar algoritmos, tales como los programas de votación ponderados, para facilitar la evaluación de los niveles de biomarcadores. Además, se pueden combinar otras pruebas clínicas con la prueba basada en biomarcadores para reducir el riesgo de evaluaciones falsas. En algunas modalidades se pueden considerar otras evaluaciones citogenéticas.

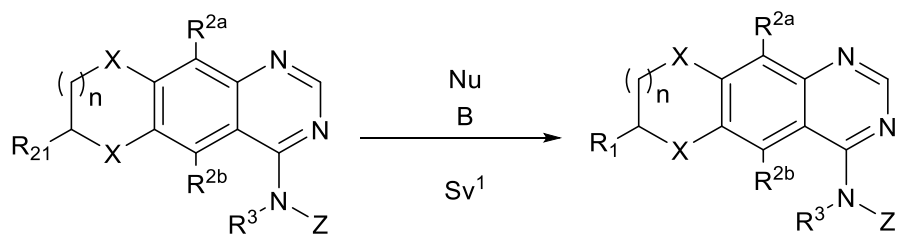
Métodos de síntesis

20

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para elaborar compuestos de la Fórmula I, I* o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, de acuerdo con el esquema 1 o el esquema 2.



Esquema 1



Esquema 2

donde:

X es O, S o NH;

Z es arilo o heteroarilo;

30

R¹ es alquilo;

cada uno de R^{2a} y R^{2b} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, halo, CN y NO₂;

R³ es hidrógeno, alquilo o acilo;

R⁴ es alcoxi;

R⁵ es alquilo;

R^{21} es un alquilo sustituido con un grupo saliente, por ejemplo, un haloalquilo o sulfonilalquilo;

B es una base;

Nu es un heterociclo que contiene nitrógeno (por ejemplo, que tiene al menos un enlace N-H), aminoalquilo o hidroxialquilo;

5 Sv^1 es un solvente; y

n es 0-3.

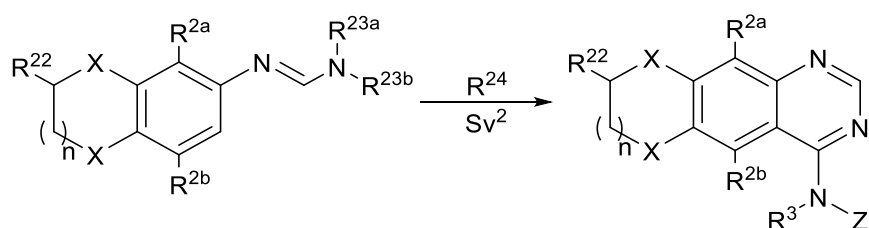
En determinadas modalidades preferidas, R^{21} es sulfonilalquilo (por ejemplo, $CH_3S(O)_2OCH_2-$).

En determinadas modalidades, B es una base nitrogenada (por ejemplo, trietilamina o diisopropiletilamina).

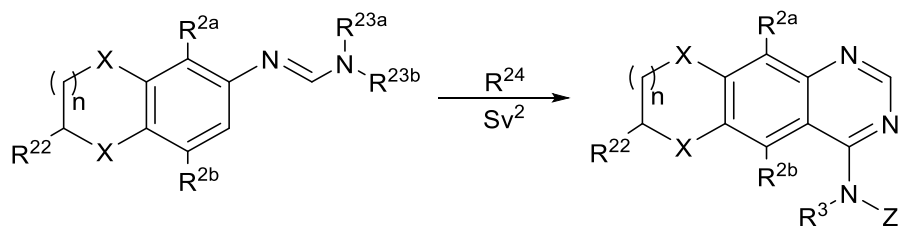
10 En determinadas modalidades, Nu es un heterociclo que contiene nitrógeno que tiene al menos un enlace N-H (por ejemplo, morfolina, N-metilpiperazina, piperidina o pirrolidina). En otras modalidades, Nu es aminoalquilo (por ejemplo, dimetilamina).

En determinadas modalidades, el solvente es un solvente aprótico (por ejemplo, dimetilformamida).

15 En determinadas modalidades preferidas, el método comprende además una etapa según el esquema 3 o 4:



Esquema 3



20 Esquema 4

donde:

R^{22} es alquilo o hidroxialquilo;

cada uno de R^{23a} y R^{23b} es alquilo;

R^{24} es aminoarilo o aminoheteroarilo; y

25 Sv^2 es un ácido.

En determinadas modalidades preferidas, R^{22} es hidroxialquilo.

En determinadas modalidades, cada uno de R^{23a} y R^{23b} es metilo.

En determinadas modalidades, R^{24} es aminoarilo. En otras modalidades, R^{24} es aminoheteroarilo.

30 En determinadas modalidades, Sv^2 es un alquilácido (por ejemplo, ácido acético).

En determinadas modalidades preferidas, la etapa del esquema 3 o 4 se realiza a una temperatura en el intervalo de 115-150 °C. En determinadas modalidades, la etapa se realiza a una temperatura en el intervalo de 125-130 °C. En determinadas modalidades, la etapa comprende además el tratamiento con una base, tal como hidróxido de amina.

35 En determinadas modalidades, el método comprende además una etapa de purificación. En

determinadas modalidades, la etapa de purificación comprende cromatografía en columna, cromatografía preparativa en capa fina o cromatografía líquida de alta resolución.

Definiciones

A menos que se definan lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos usados en la presente solicitud tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Por lo general, la nomenclatura usada en conexión con la química, cultivos celulares y tisulares, biología molecular, biología celular y cancerosa, neurobiología, neuroquímica, virología, inmunología, microbiología, farmacología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos, y técnicas de estos, tal como se describe en la presente, es la que se conoce y se usa comúnmente en la técnica.

Los métodos y técnicas de la presente descripción en general se llevan a cabo, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se tratan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, "Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, Nueva York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et ál., "Molecular Cell Biology, 4.^a ed.", W. H. Freeman & Co., Nueva York (2000); Griffiths et ál., "Introduction to Genetic Analysis, 7.^a ed.", W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); y Gilbert et ál., "Developmental Biology, 6.^a ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000).

Los términos químicos usados en la presente, a menos que se definan de otro modo en la presente, se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, tal como se ejemplifica en "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, CA. (1985).

Todo lo anterior y cualquier otra publicación, patente y solicitud de patente publicada a la que se hace referencia en esta solicitud se incorporan específicamente mediante esta referencia a la presente. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas sus definiciones específicas.

El término "agente" se usa en la presente para indicar un compuesto químico (tal como un compuesto orgánico o inorgánico, una mezcla de compuestos químicos), una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, que incluye partes de estos, así como también anticuerpos humanizados, quiméricos y humanos y anticuerpos monoclonales, una proteína o parte de estos, por ejemplo, un péptido, un lípido, un carbohidrato) o un extracto hecho a partir de materiales biológicos, tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos de animales (particularmente de mamífero). Los agentes incluyen, por ejemplo, agentes cuya estructura se conoce y aquellos cuya estructura se desconoce. La capacidad de dichos agentes para inhibir AR o promover la degradación de AR puede volverlos adecuados como "agentes terapéuticos" en los métodos y composiciones de la descripción.

Un "paciente", "sujeto" o "individuo" se usa de manera indistinta y hace referencia a un ser humano o animal no humano. Estos términos incluyen mamíferos, tales como seres humanos, primates, animales de ganado (incluidos bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (por ejemplo, caninos, felinos, etc.) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

"Tratar" una afección o paciente hace referencia a tomar medidas para obtener resultados

beneficiosos o deseados, inclusive resultados clínicos. Tal como se usa en la presente y como se entiende en la técnica, “tratamiento” es un abordaje para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, de modo no taxativo, el alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución del alcance de la enfermedad, una estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, evitar la propagación de la enfermedad, el retraso o ralentización del avance de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. El “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

El término “prevenir” es reconocido en la técnica y, cuando se utiliza en relación con una afección, como una reincidencia local (por ejemplo, dolor), una enfermedad como el cáncer, un complejo de síndromes tales como las fallas cardíacas o cualquier otro tipo de afección médica, se comprende correctamente en la técnica e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia, retrasa la aparición de los síntomas de una afección médica en un sujeto con respecto a un sujeto que no recibe la composición. Por lo tanto, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, reducir la cantidad de crecimiento canceroso detectable en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico con respecto a una población de control sin tratamiento y/o retrasar la aparición de crecimiento canceroso detectable en una población tratada en comparación con una población de control sin tratar, por ejemplo, en una cantidad estadística y/o clínicamente significativa.

“Administrar” o la “administración de” una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto puede llevarse a cabo mediante el uso de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un compuesto o un agente puede administrarse por vía intravenosa, arterial, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, ocular, sublingual, oral (mediante ingestión), intranasal (mediante inhalación), intraespinal, intracerebral y transdérmica (mediante absorción, por ejemplo, a través de un ducto de la piel). Un compuesto o agente se puede introducir también de forma adecuada mediante dispositivos poliméricos biodegradables o recargables u otros dispositivos, por ejemplo, parches o bombas, o formulaciones, que proporcionen liberación controlada, prolongada o lenta del compuesto o agente. La administración también se puede llevar a cabo, por ejemplo, una vez, múltiples veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Los métodos adecuados para administrar una sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto dependerá también, por ejemplo, de la edad y/o la condición física del sujeto y las propiedades biológicas y químicas del compuesto o agente (por ejemplo, solubilidad, digestibilidad, biodisponibilidad, estabilidad y toxicidad). En algunas modalidades, un compuesto o un agente se administra por vía oral, por ejemplo, a un sujeto por ingestión. En algunas modalidades, el compuesto o agente administrado por vía oral es una formulación de liberación prolongada o de liberación lenta, o se administra mediante el uso de un dispositivo para dicha liberación prolongada o lenta.

Tal como se usa en la presente, la expresión “administración conjunta” hace referencia a cualquier forma de administración de dos o más compuestos terapéuticos diferentes, de forma

tal que el segundo agente se administre mientras que el agente terapéutico administrado anteriormente siga teniendo efecto en el cuerpo (por ejemplo, los dos agentes son eficaces en simultáneo en el paciente, lo cual puede incluir efectos sinérgicos de ambos agentes). Por ejemplo, los diferentes compuestos terapéuticos pueden administrarse en la misma formulación o en una formulación separada, ya sea de manera simultánea o secuencial. Por lo tanto, un individuo que recibe ese tratamiento puede beneficiarse con un efecto combinado de diferentes compuestos terapéuticos.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “dosis terapéuticamente eficaz” de un fármaco o agente es una cantidad de un fármaco o un agente que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto terapéutico previsto. El efecto profiláctico completo no se produce necesariamente mediante la administración de una dosis y puede producirse solamente después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones. La cantidad eficaz precisa necesaria para un sujeto dependerá de, por ejemplo, el tamaño del sujeto, la salud y la edad, y la naturaleza y extensión de la afección que se está tratando, tal como cáncer o MDS. El trabajador calificado puede determinar fácilmente la cantidad eficaz para una situación dada mediante experimentación de rutina.

Tal como se usan en la presente, los términos “opcional” u “opcionalmente” significan que el evento o la circunstancia que se describe puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que ocurre el evento o circunstancia y casos en los que no ocurren. Por ejemplo, “alquilo sustituido opcionalmente” se refiere a los casos en los que el alquiler se puede encontrar sustituido, así como el evento o circunstancia en que el alquiler no se encuentre sustituido.

Se entiende que un experto en la técnica puede seleccionar los sustituyentes y los patrones de sustitución de los compuestos de la presente invención para producir compuestos químicamente estables y que se puedan sintetizar mediante métodos conocidos en la técnica, así como aquellos métodos que se establecen más adelante a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Si un sustituyente en sí se sustituye con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden ser en el mismo carbono o en carbonos diferentes, siempre que se produzca una estructura estable.

Tal como se usa en la presente, el término “opcionalmente sustituido” se refiere al reemplazo de uno a seis radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado que incluye, de modo no taxativo: hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, halógeno, alquiler, nitro, sililo, acilo, aciloxi, arilo, cicloalquiler, heterocicilo, amino, aminoalquiler, ciano, haloalquiler, haloalcoxi, $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{alquiler}$, $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{alquiler})_2$ o $-\text{CH}_2-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{alquiler})_2$.

Preferentemente, “sustituido opcionalmente” se refiere al reemplazo de uno a cuatro radicales hidrógeno en una estructura dada con los sustituyentes anteriormente mencionados. Más preferentemente, se reemplazan de uno a tres radicales hidrógeno con los sustituyentes tal como se mencionó anteriormente. Se entiende que es posible sustituir adicionalmente el sustituyente.

Tal como se usa en la presente, el término “alquiler” se refiere a grupos alifáticos saturados que incluyen, de modo no taxativo, grupos alquiler C_1-C_{10} de cadena recta o grupos alquiler C_1-C_{10} de cadena ramificada. Preferentemente, el grupo alquiler se refiere a grupos alquiler C_1-C_6 de

cadena recta o grupos alquilo C₁-C₆ de cadena ramificada. Más preferentemente, el grupo alquilo se refiere a grupos alquilo C₁-C₄ de cadena recta o grupos alquilo C₁-C₄ de cadena ramificada. Los ejemplos de alquilo incluyen, de modo no taxativo, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, 1-pentilo, 2-pentilo 3-pentilo, neo-pentilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 1-heptilo, 2-heptilo, 3-heptilo, 4-heptilo, 1-octilo, 2-octilo, 3-octilo o 4-octilo, y similares. El grupo alquilo se puede encontrar sustituido opcionalmente.

El término “acilo” es reconocido en la técnica y hace referencia a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbiloC(O)-, preferentemente alquiloC(O)-.

El término “acilamino” es conocido en la técnica y se refiere a un grupo amino sustituido con un grupo acilo y puede estar representado, por ejemplo, por la fórmula hidrocarbiloC(O)NH-.

El término “aciloxi” es reconocido en la técnica y hace referencia a un grupo representado por la fórmula general hidrocarbiloC(O)O-, preferentemente alquiloC(O)O-.

El término “alcoxi” se refiere a un grupo alquilo que tiene un oxígeno unido a este. Los grupos alcoxi representativos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, terc-butoxi y similares.

El término “alcoxialquilo”, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi y puede representarse por la fórmula general alquil-O-alquilo.

El término “alquilo” hace referencia a grupos alifáticos saturados, que incluyen grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En modalidades preferidas, un alquilo de cadena lineal o ramificada tiene 30 átomos de carbono o menos en su estructura principal (por ejemplo, C₁₋₃₀ para cadenas rectas, C₃₋₃₀ para cadenas ramificadas) y más preferentemente 20 o menos.

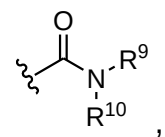
Además, el término “alquilo” tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones pretende incluir tanto grupos alquilo no sustituidos como alquilo sustituidos, este último hace referencia a restos alquilo que tienen sustituyentes que remplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura de hidrocarburo, lo que incluye grupos haloalquilo tales como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc.

El término “C_{x-y}” o “C_x-C_y” cuando se usa junto un resto químico, tal como acilo, aciloxi, alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxi significa que incluye grupos que contienen carbonos x a y en la cadena. Alquilo Coindica un hidrógeno donde el grupo está en una posición terminal, un enlace en caso de ser interno. Un grupo alquilo C₁₋₆, por ejemplo, contiene de uno a seis átomos de carbono en la cadena.

Tal como se utiliza en la presente, el término “alquilamino” hace referencia a un grupo amino sustituido con al menos un grupo alquilo.

El término “alquiltio”, tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo tiol sustituido con un grupo alquilo y puede representarse por la fórmula general alquiloS-.

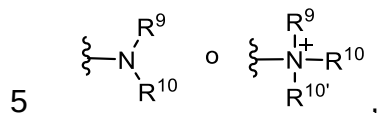
El término “amida” tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo



donde cada R⁹ y R¹⁰ representan cada uno de forma independiente un hidrógeno o un grupo hidrocarbilo o R⁹ y R¹⁰ tomados junto con el átomo de N al que se unen completan un heterociclo

que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo.

Los términos “amina” y “amino” son reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas no sustituidas como sustituidas y a sales de estas, por ejemplo, un resto que se puede representar mediante



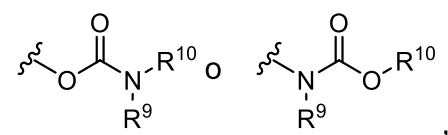
donde cada R^9 , R^{10} y $\text{R}^{10'}$ representan cada uno de forma independiente un hidrógeno o un grupo hidrocarbilo o se toman R^9 y R^{10} en conjunto con el átomo de N al que se encuentran unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura anular.

10 Tal como se utiliza en la presente, el término “aminoalquilo” hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo amino.

Tal como se utilizan en la presente, el término “aralquilo” hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo.

15 Tal como se utiliza en la presente, el término “arilo” incluye grupos aromáticos de un solo anillo sustituido o no sustituido, en los que cada átomo del anillo es carbono. Preferentemente el anillo es un anillo de 5 a 7 miembros, más preferentemente un anillo de 6 miembros. El término “arilo” también incluye sistemas de anillos policíclicos con dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, donde al menos uno de los anillos es aromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos. Los grupos arilo incluyen benceno, 20 naftaleno, fenantreno, fenol, anilina, y similares.

El término “carbamato” se conoce en la técnica y se refiere a un grupo



donde R^9 y R^{10} representan independientemente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo..

25 El término “carbociclilalquilo”, tal como se usa en la presente, hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo carbociclo.

El término “carbociclo” incluye anillos monocíclicos de 5-7 miembros y bicíclicos de 8-12 miembros. Cada anillo de un carbociclo bicíclico puede seleccionarse de entre anillos saturados, insaturados y aromáticos. Un carbociclo incluye moléculas bicíclicas en las que uno, dos, tres o más átomos son compartidos entre los dos anillos. La expresión “carbociclo fusionado” hace 30 referencia a un cicloalquilo bicíclico en el que cada uno de los anillos comparte dos átomos adyacentes con el otro anillo. Cada anillo de un carbociclo fusionado puede seleccionarse de entre anillos saturados, insaturados y aromáticos. En un ejemplo de modalidad, un anillo aromático, por ejemplo, fenilo, puede estar fusionado con un anillo saturado o insaturado, por ejemplo, ciclohexano, ciclopentano o ciclohexeno. Cualquier combinación de anillos bicíclicos saturados, insaturados y aromáticos, según la valencia lo permita, se incluye en la definición de 35 carbocíclico. Ejemplos de “carbociclos” incluyen ciclopentano, ciclohexano, biciclo[2,2,1]heptano, 1,5-ciclooctadieno, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, biciclo[4,2,0]oct-3-eno, naftaleno y adamantano. Ejemplos de carbociclos fusionados incluyen decalina, naftaleno,

1,2,3,4-tetrahidronaftaleno, biciclo[4,2,0]octano, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-indeno y biciclo[4,1,0]hept-3-eno. Los “carbociclos” pueden estar sustituidos en cualquiera de una o más posiciones capaces de portar un átomo de hidrógeno.

El término “carbociclilalquilo”, tal como se usa en la presente, hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo carbociclo.

El término “carbonato” se conoce en la técnica y se refiere a un grupo $-\text{OCO}_2-$.

El término “carboxi”, tal como se usan en la presente, hace referencia a un grupo representado por la fórmula $-\text{CO}_2\text{H}$.

Tal como se utiliza en la presente, el término “éster” hace referencia a un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^9$ donde R^9 representa un grupo hidrocarbilo.

El término “éter”, tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo hidrocarbilo enlazado a través de un oxígeno a otro grupo hidrocarbilo. Por consiguiente, un sustituyente éter de un grupo hidrocarbilo puede ser hidrocarbilo-O-. Los éteres pueden ser simétricos o no simétricos. Los ejemplos de éteres incluyen, de modo no taxativo, heterociclo-O-heterociclo y aril-O-heterociclo. Los éteres incluyen grupos “acloxialquilo”, que pueden estar representados por la fórmula general alquil-O-alquilo.

Los términos “halo” y “halógeno” tal como se usan en la presente significan halógeno e incluyen cloro, fluoro, bromo y yodo.

Tal como se utilizan en la presente, los términos “hetaralquilo” o “heteroaralquilo” hacen referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo hetarilo.

Los términos “heteroarilo” y “hetarilo” incluyen estructuras anulares simples aromáticas sustituidas y no sustituidas, preferentemente, anillos de 5 a 7 miembros, más preferentemente, anillos de 5 a 6 miembros y dichas estructuras anulares incluyen al menos un heteroátomo, preferentemente, uno a cuatro heteroátomos, más preferentemente, uno o dos heteroátomos.

Los términos “heteroarilo” y “hetarilo” también incluyen sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos, en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, donde al menos uno de los anillos es heteroaromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrolo, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina y similares.

El término “heteroátomo”, tal como se usa en la presente, significa un átomo de cualquier elemento que no sea carbono o hidrógeno. Los heteroátomos preferidos son nitrógeno, oxígeno y azufre.

Tal como se usa en la presente, el término “heterociclilalquilo” hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un heterociclo.

Los términos “heterociclilo”, “heterociclo” y “heterocíclico” hacen referencia a estructuras de anillos no aromáticos con o sin sustitución, preferentemente, anillos de 3 a 10 miembros, más preferentemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillos incluyen al menos un heteroátomo, preferentemente de uno a cuatro heteroátomos, más preferentemente de uno o dos heteroátomos. Los términos “heterociclilo” y “heterocíclico” también incluyen sistemas de anillos policíclicos con dos o más anillos cíclicos, en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos, donde al menos uno de los anillos es heterocíclico, por ejemplo, los

otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclicos. Los grupos heterocíclicos incluyen, por ejemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, lactamas y similares.

El término “hidrocarbilo”, tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo que está unido mediante un átomo de carbono que no tiene un sustituyente =O o =S y típicamente tiene al menos un enlace de carbono-hidrógeno y una estructura principalmente de carbono pero opcionalmente incluye heteroátomos. Por lo tanto, los grupos como metilo, etoxietilo, 2-piridilo y trifluorometilo se consideran hidrocarbilo a los efectos de la presente solicitud, pero los sustituyentes como acetilo (que tiene un sustituyente =O en el carbono de enlace) y etoxi (que está enlazado a través de oxígeno, no carbono) no lo son. Los grupos hidrocarbilo incluyen, de modo no taxativo, arilo, heteroarilo, carbociclo heterociclilo, alquilo, alquenilo, alquinilo y combinaciones de estos.

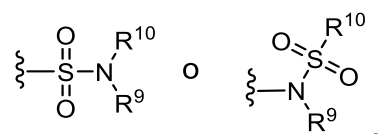
Tal como se utiliza en la presente, el término “hidroxialquilo” hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo hidroxilo.

Se pretende que el término “inferior”, cuando se usa junto con un resto químico, tal como acilo, aciloxi, alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxi, incluya grupos donde haya diez o menos átomos en el sustituyente, preferentemente seis o menos. Un “alquilo inferior”, por ejemplo, se refiere a un grupo alquilo que contiene diez o menos átomos de carbono, preferentemente seis o menos. En determinadas modalidades, los sustituyentes acilo, aciloxi, alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxi definidos en la presente son respectivamente acilo inferior, aciloxi inferior, alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior o alcoxi inferior, ya sea que aparezcan solos o en combinación con otros sustituyentes, tal como en las menciones de hidroxialquilo y aralquilo (en cuyo caso, por ejemplo, no se cuentan los átomos dentro del grupo arilo cuando se cuentan los átomos de carbono en el sustituyente alquilo).

Los términos “policiclilo”, “policiclo” y “policíclico”, tal como se utiliza en la presente, hacen referencia a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclicos) donde dos o más átomos son comunes a dos anillos contiguos, por ejemplo, los anillos son “anillos fusionados”. Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido o no sustituido. En determinadas modalidades, cada anillo del policiclo contiene de 3 a 10 átomos en el anillo, preferentemente de 5 a 7.

El término “sulfato” es reconocido en la técnica y hace referencia al grupo –OSO₃H, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

El término “sulfonamida” es conocido en la técnica y se refiere al grupo representado por las fórmulas generales



donde R⁹ y R¹⁰ representan independientemente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo.

El término “sulfóxido” se conoce en la técnica y se refiere a un grupo –S(O)-.

El término “sulfonato” es reconocido en la técnica y hace referencia al grupo SO₃H, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

El término “sulfona” se conoce en la técnica y se refiere a un grupo –S(O)₂-.

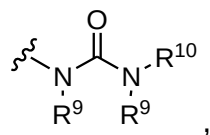
El término “sustituido” hace referencia a restos con sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal. Se entenderá que “sustitución” o “sustituido con” incluye la condición implícita de que tal sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no experimentan espontáneamente transformación tal como por transposición, ciclación, eliminación, etc. Tal como se usa en la presente, se contempla que el término “sustituido” incluya todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más e iguales o diferentes para los compuestos orgánicos adecuados. Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permitido de compuestos orgánicos descritos en la presente que satisfacen las valencias de los heteroátomos. Los sustituyentes pueden incluir cualquier sustituyente descrito en la presente, por ejemplo, un halógeno (por ejemplo, fluoro), un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcóxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un alcóxido, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralkilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los expertos en la técnica comprenderán que los restos sustituidos en la cadena de hidrocarburo pueden estar ellos mismos sustituidos, si corresponde.

Tal como se utiliza en la presente, el término “tioalquilo” hace referencia a un grupo alquilo sustituido con un grupo tiol.

Tal como se utiliza en la presente, el término “tioéster” hace referencia a un grupo $-C(O)SR^9$ o $-SC(O)R^9$ donde R^9 representa un hidrocarbilo.

El término “tioéter”, tal como se usa en la presente, es equivalente a un éter, donde el oxígeno se reemplaza con un azufre.

El término “urea” es conocido en la técnica y puede estar representado por la fórmula general



donde R^9 y R^{10} representan independientemente hidrógeno o hidrocarbilo.

El término “modular”, tal como se utiliza en la presente, incluye la inhibición o la supresión de una función o actividad (tal como la proliferación celular), así como también la mejora de una función o actividad.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se reconoce en la técnica. En determinadas modalidades, el término incluye composiciones, excipientes, adyuvantes, polímeros y otros materiales y/o formas de dosificación que se encuentran dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos,

según una relación beneficio/riesgo razonable.

“Sal farmacéuticamente aceptable” o “sal” se usa en la presente para hacer referencia a una sal de adición de ácido o una sal de adición básica que es adecuada para el tratamiento de pacientes o compatible con este.

- 5 La expresión “sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente, significa cualquier sal orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto base representado por la Fórmula I. Los ácidos inorgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos clorhídricos, bromhídricos, sulfúricos y fosfóricos, así como sales metálicas tales como monohidrógeno ortofosfato de sodio e hidrógeno sulfato de potasio. Los ácidos
- 10 orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos mono, di y tricarboxílicos tales como ácido glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, benzoico, fenilacético, cinámico y salicílico, así como también ácidos sulfónicos, tales como ácidos metanosulfónico y sulfónico de p-tolueno. Se pueden formar las sales mono o diácidas y tales sales pueden existir en forma sustancialmente
- 15 anhidra, solvatada o hidratada. En general, las sales de adición ácidas de compuestos de la Fórmula I son más solubles en agua y diversos solventes orgánicos hidrófilos, y generalmente muestran puntos de fusión más altos en comparación consus formas de bases libres. La selección de la sal adecuada será conocida por el experto en la técnica. Pueden usarse otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, oxalatos, por ejemplo, en el aislamiento
- 20 de compuestos de la Fórmula I para el uso en laboratorio, o para la conversión posterior en una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable.

- La expresión “sal de adición básica farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente, significa cualquier sal de adición básica orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto ácido representado por la Fórmula I o cualquiera de sus productos intermedios. Las
- 25 bases inorgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o bario hidróxido. Las bases orgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas tales como metilamina, trimetilamina y picolina y amoníaco. La selección de la sal adecuada se encontrará dentro del conocimiento del experto en la técnica.

- 30 Muchos de los compuestos útiles en los métodos y composiciones de esta descripción tienen al menos un centro estereogénico en su estructura. Este centro estereogénico puede estar presente en una configuración R o S, dicha notación R y S se utiliza de acuerdo con las reglas descritas en Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30. La descripción contempla todas las formas estereoisoméricas tales como las formas enantioméricas y diastereoméricas de los
- 35 compuestos, sales, profármacos o mezclas de estos (lo que incluye todas las mezclas posibles de estereoisómeros). Véase, por ejemplo, WO 01/062726.

Asimismo, determinados compuestos que contienen grupos alquenilo pueden existir como isómeros Z (zusammen) o E (entgegen). En cada caso, la descripción incluye tanto isómeros individuales separados como mezclados.

- 40 Algunos de los compuestos pueden existir también en formas tautoméricas. A pesar de que no se indica de forma explícita en la fórmula anterior descrita en la presente, se pretende que tales formas estén incluidas en el alcance de la presente descripción.

“Profármaco” o “profármaco farmacéuticamente aceptable” hace referencia a un compuesto que se metaboliza, por ejemplo, hidroliza u oxida, en el hospedador después de la administración para formar el compuesto de la presente descripción (por ejemplo, compuestos de la fórmula I). Los ejemplos típicos de profármacos incluyen compuestos que tienen grupos (protectores) escindibles o biológicamente lábiles en un resto funcional del compuesto activo. Los profármacos incluyen compuestos que pueden estar oxidados, reducidos, aminados, desaminados, hidroxilados, deshidroxilados, hidrolizados, deshidrolizados, alquilados, desalquilados, acilados, desacilados, fosforilados, o desfosforilados para producir el compuesto activo. Los ejemplos de profármacos que usan éster o fosforamido como grupos (protectores) escindibles o biológicamente lábiles se describen en las patentes estadounidenses 6,875,751, 7,585,851 y 7,964,580, cuyas descripciones se incorporan a la presente mediante esta referencia. Los profármacos de la presente descripción se metabolizan para producir un compuesto de la Fórmula I. La presente descripción incluye, dentro de su alcance, profármacos de los compuestos descritos en la presente. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en “Design of Prodrugs” Ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente, hace referencia a un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un filtro líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación útil para formular un fármaco para uso medicinal o terapéutico.

La expresión “registro de solubilidad”, “LogS” o “logS”, tal como se utiliza en la presente se usa en la técnica para cuantificar la solubilidad acuosa de un compuesto. La solubilidad acuosa de un compuesto afecta considerablemente sus características de absorción y distribución. Una baja solubilidad a veces va junto con una poca absorción. El valor logS es un algoritmo desprovisto de unidad (base 10) de la solubilidad medida en mol/litro.

Composiciones farmacéuticas

Es posible utilizar las composiciones y métodos de la presente invención para tratar un individuo que lo necesite. En determinadas modalidades, el individuo es un mamífero como un ser humano o un mamífero no humano. Cuando se administra a un animal, tal como un ser humano, la composición o el compuesto se administra preferentemente como una composición farmacéutica que comprende, por ejemplo, un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En la técnica se conocen los portadores farmacéuticamente aceptables e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas, tales como agua o solución salina fisiológicamente amortiguada u otros solventes o portadores, tales como glicoles, glicerol, aceites, tales como aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables. En modalidades preferidas, cuando dichas composiciones farmacéuticas son para administración a seres humanos, particularmente para vías de administración invasivas (es decir, vías, tales como inyección o implante, que evitan el transporte o difusión a través de una barrera epitelial), la solución acuosa es una solución libre de pirógenos o sustancialmente libre de pirógenos. Los excipientes se pueden seleccionar, por ejemplo, para provocar la liberación retardada de un agente o para dirigirse de forma selectiva a una o más células, tejidos u órganos. La composición farmacéutica puede encontrarse en forma de dosificación unitaria tal como comprimido, cápsula (que incluye

cápsula dispersable y cápsula de gelatina), gránulo, líofilo para reconstitución, polvo, solución, jarabe, supositorio, inyección o similar. La composición también puede estar presente en un sistema de administración transdérmica, por ejemplo, un parche dérmico. La composición también se puede encontrar en una solución adecuada para administración tópica, tal como una loción, crema o ungüento.

Un portador farmacéuticamente aceptable puede contener agentes fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar, aumentar la solubilidad o aumentar la absorción de un compuesto, tal como un compuesto de la invención. Dichos agentes fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizadores o excipientes. La elección de un portador farmacéuticamente aceptable, incluso de un agente fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración de la composición. La preparación o composición farmacéutica puede ser un sistema de administración de fármacos de autoemulsión o un sistema de administración de fármacos de automicroemulsión. La composición farmacéutica (preparación) también puede ser un liposoma u otra matriz polimérica, que puede tener, por ejemplo, un compuesto de la invención incorporado en esta. Los liposomas, por ejemplo, que comprenden fosfolípidos u otros lípidos, son portadores no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables cuya elaboración y administración es relativamente simple.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se utiliza en la presente para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para utilizarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin un exceso de toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, de forma proporcional con una relación riesgo/beneficio razonable.

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente, hace referencia a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación líquido o sólido. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Una composición farmacéutica (preparación) puede administrarse a un sujeto mediante

cualquier cantidad de vías de administración que incluyen, por ejemplo, la vía oral (por ejemplo, pociones como en soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas, comprimidos, cápsulas (lo cual incluye cápsulas dispersables y cápsulas de gelatina), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua); la absorción a través de la mucosa oral (por ejemplo, de manera sublingual); subcutánea; transdérmica (por ejemplo, como un parche aplicado en la piel); y la vía tópica (por ejemplo, como una crema, un ungüento o un aerosol aplicado a la piel). El compuesto también se puede formular para inhalación. En determinadas modalidades, un compuesto puede simplemente disolverse o suspenderse en agua estéril. Los detalles de las vías de administración apropiadas y composiciones adecuadas para estas pueden encontrarse, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6,110,973, 5,763,493, 5,731,000, 5,541,231, 5,427,798, 5,358,970 y 4,172,896, así como también en las patentes citadas en estas.

Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará en función del hospedador que se esté tratando y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de excipiente para producir una forma de dosificación única será por lo general la cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, sobre cien por ciento, esta cantidad variará de alrededor de 1 por ciento a alrededor de noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente, de alrededor de 5 por ciento a alrededor de 70 por ciento, más preferentemente de alrededor de 10 por ciento a alrededor de 30 por ciento.

Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen el paso de asociar un compuesto activo, tal como un compuesto de la invención con el portador y, opcionalmente uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan al asociar de manera uniforme y profunda un compuesto de la presente invención con portadores líquidos o portadores sólidos divididos en trozos finos, o ambos, y luego, si es necesario, dándole forma al producto.

Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas (que incluyen cápsulas dispersables y cápsulas de gelatina), sellos, píldoras, comprimidos, grageas (mediante el uso de una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), líofilo, polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite o como un elixir o jarabe o como pastillas (mediante el uso de una base inerte, tales como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno con una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como un ingrediente activo. Las composiciones o compuestos también pueden administrarse como un bolo, electuario o pasta.

Para preparar formas de dosificación sólidas para la administración oral (cápsulas (que incluyen cápsulas dispersables y cápsulas de gelatina), comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el ingrediente activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido

silícico; (2) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución
 5 tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de estos; (10) agentes de formación de complejos, tales como ciclodextrinas
 10 modificadas y no modificadas; y (11) agentes colorantes. En el caso de cápsulas (que incluyen cápsulas dispersables y cápsulas de gelatina), comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes amortiguadores. También es posible emplear composiciones sólidas similares como rellenos en cápsulas rellenas de gelatina blandas o duras mediante el uso de excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así
 15 como también polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Se puede fabricar un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar mediante el uso de un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio o carboximetilcelulosa
 20 de sodio reticulada), agente tensioactivo o de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar al moldear en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas, tales como grageas, cápsulas (que incluyen las cápsulas dispersables y cápsulas de gelatina),
 25 píldoras y gránulos, pueden calificarse o prepararse opcionalmente con recubrimientos y envolturas, como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en este mediante el uso de, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación
 30 deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua en condiciones estériles o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden, opcionalmente,
 35 contener agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que libere únicamente el o los ingredientes activos o, preferentemente, en una parte determinada del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden emplear incluyen ceras y sustancias poliméricas. Los ingredientes activos también pueden encontrarse en forma microencapsulada, si corresponde, con uno o
 40 más de los excipientes antemencionados.

Las formas de dosificación líquida útiles para administración oral incluyen emulsiones, liófilos para reconstitución, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elíxires

farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes que se utilizan comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, ciclodextrinas y derivados de estas, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de estos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes de isostearilo etoxilados, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de estos.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, solución amortiguadora o propelente que sea necesario.

Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o mezclas de estos.

Los polvos y los aerosoles pueden contener, además de un compuesto activo, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto de la presente invención al cuerpo. Tales formas de dosificación se pueden elaborar al disolver o dispersar el compuesto activo en el medio apropiado. Los potenciadores de absorción también se pueden utilizar para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo se puede controlar ya sea al proporcionar una membrana de control de la velocidad o al dispersar el compuesto en un gel o una matriz poliméricos.

Las frases “administración parenteral” y “administrado de forma parental”, tal como se utilizan en la presente, significan modos de administración que no sean la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección e incluye, de modo no taxativo, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión. Las composiciones farmacéuticas

adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos activos en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden

5 contener antioxidantes, soluciones amortiguadoras, bacterioestáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor o agentes de suspensión o espesantes deseados.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como

10 glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Es posible mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, al mantener el tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso tensioactivos.

Estas composiciones pueden también contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares,

20 cloruro de sodio y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, se desea enlentecer la absorción del fármaco de inyección subcutánea o intramuscular para prolongar el efecto de un fármaco. Esto se puede realizar mediante el uso

25 de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tenga baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. De manera alternativa, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado parenteralmente se logra al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se pueden realizar mediante la formación de matrices microencapsuladas de los compuestos objeto en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Es posible controlar la velocidad de liberación del fármaco en función de la relación del fármaco respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular

30 utilizado. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan al capturar el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

Para su uso en los métodos de la presente invención, los compuestos activos se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1 a 99,5

40 % (más preferentemente, 0,5 a 90 %) de ingrediente activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

También se pueden proporcionar los métodos de introducción mediante dispositivos recargables o biodegradables. Se han desarrollado diversos dispositivos poliméricos de

liberación lenta que se evaluaron *in vivo* en los últimos años para el suministro controlado de fármacos, lo cual incluye compuestos biofarmacéuticos proteicos. Se puede utilizar una variedad de polímeros biocompatibles (que incluyen hidrogeles), lo que incluye polímeros tanto biodegradables como no degradables, para formar un implante para la liberación sostenida de un compuesto en un sitio objetivo en particular.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particular, sin resultar tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto o la combinación de compuestos particular empleada o el éster, sal o amida de estos, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción de el o los compuestos particulares empleados, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el o los compuestos particulares empleados, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia clínica previa del paciente que se trata y factores similares conocidos en la técnica médica.

Un médico o veterinario con experiencia en la técnica puede determinar e indicar fácilmente la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar las dosis del compuesto o composición farmacéutica con niveles inferiores a los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado. "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa a la concentración de un compuesto que es suficiente para provocar el efecto terapéutico deseado. Generalmente, se entiende que la cantidad eficaz del compuesto variará según el peso, sexo, edad e historia clínica del sujeto. Otros factores que influyen en la cantidad eficaz pueden incluir, de modo no taxativo, la gravedad de la afección del paciente, el trastorno a ser tratado, la estabilidad del compuesto y, de ser deseado, otro tipo de agente terapéutico administrado con el compuesto de la invención. Se puede administrar una dosis total mayor mediante múltiples administraciones del agente. Los métodos para determinar la eficacia y dosificación son conocidos por los expertos en la técnica (Isselbacher et ál. (1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 13.^a ed., 1814-1882, que se incorpora a la presente mediante referencia).

En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto activo utilizado en las composiciones y métodos de la invención será la cantidad del compuesto que represente la dosis mínima eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores que descritos anteriormente.

Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo se puede administrar como uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. En determinadas modalidades de la presente invención, el compuesto activo puede administrarse dos o tres veces al día. En modalidades preferidas, el compuesto activo se administrará una vez al día.

El paciente que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, lo que incluye primates, en particular humanos y otros mamíferos tales como equinos, bovinos, cerdo, ovejas,

gatos y perros; aves de corral y mascotas en general.

En determinadas modalidades, los compuestos de la invención pueden usarse solos o administrarse en conjunto con otro tipo de agente terapéutico.

La presente descripción incluye el uso de sales farmacéuticamente aceptables de compuestos

5 de la invención en las composiciones y métodos de la presente invención. En determinadas modalidades, las sales contempladas de la invención incluyen, de modo no taxativo, sales de amonio de alquilo, dialquilo, trialquilo o tetra-alquilo. En determinadas modalidades, las sales contempladas de la invención incluyen, de modo no taxativo, L-arginina, benentamina, benzatina, betaína, hidróxido de calcio, colina, deanol, dietanolamina, dietilamina, 2-
10 (dietilamino)etanol, etanolamina, etilenediamina, N-metilglucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, litio, L-lisina, magnesio, 4-(2-hidroxietil)morfolina, piperazina, potasio, 1-(2-hidroxietil)pirrolidina, sodio, trietanolamina, trometaamina y sales de cinc. En determinadas modalidades, las sales contempladas de la invención incluyen, de modo no taxativo, Na, Ca, K, Mg, Zn u otras sales metálicas. En determinadas modalidades, las sales contempladas de la invención incluyen, de
15 modo no taxativo, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido 2,2-dicloroacético, ácido 2-hidroxietanesulfónico, ácido 2-oxoglutarico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido 4-aminosalicílico, ácido acético, ácido adípico, ácido L-ascórbico, ácido L-aspártico, ácido benzenesulfónico, ácido benzoico, ácido (+)-camfórico, ácido (+)-camfor-10-sulfónico, ácido cáprico (ácido decanoico), ácido caproico (ácido hexanoico), ácido caprílico (ácido octanoico),
20 ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanesulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido dglucoheptónico, ácido dglucónico, ácido dglucurónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido glicerofosfórico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido isobutírico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido laurico, ácido maleico, ácido
25 L-málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanesulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido oleico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido sebáico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido L-tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y sales ácidas del
30 ácido undecilénico.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables también pueden existir como diversos solvatos, tal como con agua, metanol, etanol, dimetilformamida, y similares. También se pueden preparar mezclas de dichos solvatos. La fuente de ese solvente puede provenir del solvente de cristalización, inherente en el solvente de preparación o cristalización, o adventicio
35 con respecto a ese solvente.

Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, endulzantes, agentes saborizantes y aromatizantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones.

40 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales

como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA, por sus siglas en inglés), hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

5

EJEMPLOS

La invención, que se ha descrito en términos generales, se comprenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente para ilustrar determinados aspectos y modalidades de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

10 Ejemplo 1: Preparación de compuestos ilustrativos de la serie JGK

Procedimientos generales: los compuestos de la serie JGK pueden prepararse mediante los métodos descritos a continuación o mediante cualquier otro método adecuado. Los compuestos de la serie JGK a veces se denominan en la presente con un prefijo JCN. Todas las reacciones se llevaron a cabo de forma rutinaria bajo una atmósfera inerte de argón. A menos que se indique lo contrario, los materiales se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación. Todos los solventes se purificaron y secaron mediante técnicas estándar justo antes de su uso. THF y Et₂O se habían destilado poco antes a partir de sodio y benzofenona. El cloruro de metileno, el tolueno y el benceno se purificaron a reflujo con CaH₂. Las reacciones se comprobaron mediante cromatografía en capa fina (Kieselgel 60 F254, Merck). Las manchas se detectaron viéndolas bajo luz ultravioleta y con coloreado con carbonización después de sumergirlas en una solución de *p*-anisaldehído o una solución de ácido fosfomolibdico. En el tratamiento acuoso, todas las soluciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtraron antes de la evaporación rotatoria a presión de bomba de agua. Los compuestos en bruto se purificaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (SilicaFlash P60, 230-400 mesh, SiliCycle Inc). Los espectros de NMR de protones (¹H) y carbono (¹³C) se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AV 400 (400/100 MHz) o Bruker AV500 (500/125 MHz). Los desplazamientos químicos se informan en unidades de ppm con Me₄Si o CHCl₃ como patrón interno. Los patrones de división se denominan: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; b, ancho. Los datos de espectrometría de masas de alta resolución se obtuvieron mediante el uso de Thermo Fisher Scientific Exactive Plus con una fuente IonSense ID-CUBE DART.

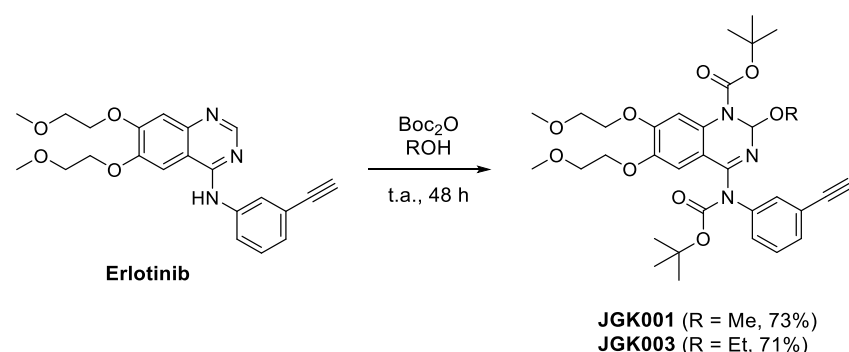
15

20

25

30

Preparación de JGK001, JGK003



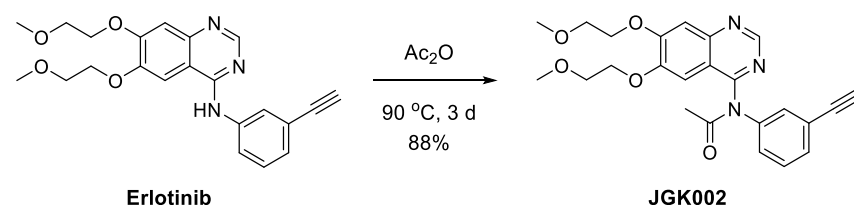
[JGK001] A una solución de erlotinib (134 mg, 0,3406 mmol) en metanol anhidro (5,0 mL) se le añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (228 mg, 1,7029 mmol) en una parte a temperatura ambiente. Después de agitar a la misma temperatura durante 48 h se concentró al vacío. La

35

mezcla de reacción se diluyó con H₂O (30 mL) y se extrajo con EtOAc (30 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 3/1) para proporcionar **JGK001** (156 mg, 73%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,86 (s, 1 H), 7,43 (s, 1 H), 7,20-7,23 (m, 2 H), 7,16 (td, *J* = 1,2, 7,6 Hz, 1 H), 7,09 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 4,16-4,25 (m, 4 H), 3,80 (t, *J* = 5,2 Hz, 2 H), 3,77 (t, *J* = 5,2 Hz, 2 H), 3,45 (s, 3 H), 3,44 (s, 3 H), 3,03 (s, 1 H), 1,55 (s, 9 H), 1,11 (s, 9 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 152,1, 151,5, 149,2, 148,8, 145,7, 142,7, 130,6, 128,9, 127,4, 125,3, 122,6, 121,5, 114,7, 111,4, 108,0, 90,7, 83,7, 83,3, 82,9, 76,8, 70,9, 70,7, 68,8, 68,7, 59,2, 59,1, 55,0, 28,2, 27,3; HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 626,3061 [calculada para C₃₃H₄₃N₃O₉ 625,2993].

[JGK003] A una solución de erlotinib (101 mg, 0,2567 mmol) en etanol anhidro (2,6 mL) se le añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (172 mg, 1,2836 mmol) en una parte a temperatura ambiente. Después de agitar a la misma temperatura durante 48 h se concentró al vacío. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (30 mL) y se extrajo con EtOAc (30 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 3/1) para proporcionar **JGK003** (117 mg, 71%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,86 (s, 1 H), 7,43 (s, 1 H), 7,34 (s, 1 H), 7,21-7,24 (m, 2 H), 7,16 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 7,10 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 4,17-4,25 (m, 4 H), 3,61-3,82 (m, 6 H), 3,46 (s, 3 H), 3,45 (s, 3 H), 3,02 (s, 1 H), 1,55 (s, 9 H), 1,23 (t, *J* = 6,8 Hz, 3 H), 1,12 (s, 9 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 152,0, 151,4, 149,2, 148,9, 145,5, 143,0, 130,8, 128,8, 127,3, 125,3, 122,5, 121,7, 114,7, 111,3, 107,9, 89,3, 83,7, 83,2, 82,8, 76,7, 70,9, 70,7, 68,8, 68,6, 63,0, 59,2, 59,1, 28,2, 27,4, 14,6; HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 640,3211 [calculada para C₃₄H₄₅N₃O₉ 639,3150].

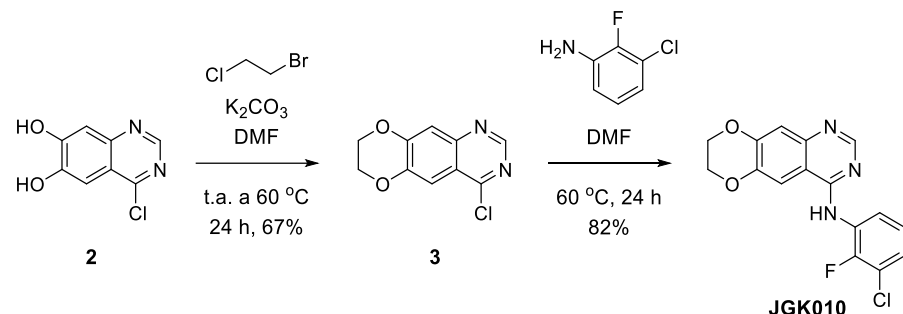
Preparación de JGK002



A un sólido de erlotinib (165 mg, 0,4194 mmol) se le añadió anhídrido acético (5,0 mL). Después de calentarla a 90 °C (temperatura del baño) con agitación durante 3 d, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se neutralizó con NaHCO₃ acuoso saturado (20 mL) y se diluyó con EtOAc (20 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 1/1 a 1/3) para proporcionar **JGK002** (161 mg, 88% de rendimiento aislado); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,06 (s, 1 H), 7,45 (t, *J* = 1,6 Hz, 1 H), 7,37-7,39 (m, 2 H), 7,36 (s, 1 H), 7,30-7,34 (m, 1 H), 7,15 (s, 1 H), 4,32 (t, *J* = 4,8 Hz, 2 H), 4,16 (t, *J* = 4,8 Hz, 2 H), 3,86 (t, *J* = 4,8 Hz, 2 H), 3,79 (t, *J* = 4,8 Hz, 2 H), 3,46 (s, 3 H), 3,45 (s, 3 H), 3,06 (s, 1 H), 2,14 (s, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ

170,5, 158,8, 156,1, 153,5, 151,1, 150,8, 141,0, 130,9, 130,3, 129,3, 127,5, 123,4, 117,2, 107,9, 103,1, 82,4, 78,4, 70,6, 70,3, 68,9, 68,7, 59,3, 59,3, 23,7; HRMS-ESI $[M+H]^+$ hallada 436,1811 [calculada para $C_{24}H_{25}N_3O_5$ 435,1788].

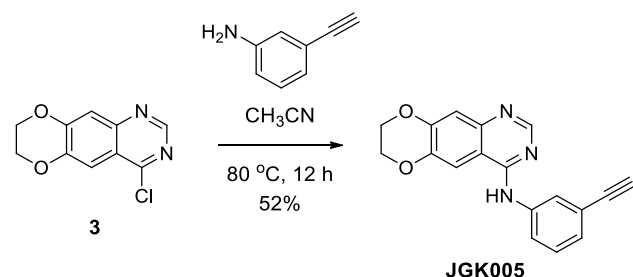
Preparación de JGK010, JGK032: *procedimiento general para la sustitución con análogos de anilina*



[Ciclización] A una solución de diol **2** (530 mg, 2,6959 mmol) en DMF (13,5 mL, 0,2 M) se le añadió en una parte carbonato de potasio (1490 mg), seguido de la adición sucesiva por goteo de 1-bromo-2-cloroetano (1,3 mL) a temperatura ambiente bajo Ar. Después de calentarla a $60^\circ C$ (temperatura del baño) con agitación durante 24 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se inactivó con H_2O (50 mL). Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con EtOAc (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H_2O y salmuera saturada, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 6/1 to 3/1) para proporcionar cloroquinazolina fusionada **3** (404 mg, 67%); ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,84 (s, 1 H), 7,64 (s, 1 H), 7,47 (s, 1 H), 4,43-4,45 (m, 2 H), 4,39-4,42 (m, 2 H). [compuesto conocido; Chilin, A. et ál. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 1862-1866]

[JGK010] A una solución de cloroquinazolina **3** fusionada (114 mg, 0,5120 mmol) en DMF (2,6 mL) se le añadió por goteo 3-cloro-2-fluoroanilina (0,10 mL) a temperatura ambiente. Después de calentarla a $60^\circ C$ (temperatura del baño) con agitación durante 24 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con Et_2O (30,0 mL) para proporcionar una suspensión blanca. El sólido blanco resultante se lavó sucesivamente con Et_2O (2×50 mL) y se recogió para proporcionar **JGK010** (140 mg, 82%); ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,68 (s, 1 H), 8,59 (ddd, $J = 3,2, 6,8, 6,8$ Hz, 1 H), 7,39 (s, 1 H), 7,34 (s, 1 H), 7,29 (s, 1 H), 7,10-7,18 (m, 2 H), 4,38-4,43 (m, 4 H); ^1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11,78 (s, 1 H), 8,79 (s, 1 H), 8,45 (s, 1 H), 7,62 (t, $J = 7,0$ Hz, 1 H), 7,50 (t, $J = 7,0$ Hz, 1 H), 7,43 (s, 1 H), 7,34 (t, $J = 8,0$ Hz, 1 H), 4,46-4,53 (m, 2 H), 4,40-4,52 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 159,8, 154,0, 152,2, 149,9, 145,7, 135,2, 129,9, 128,1, 126,4, 125,8, 120,9, 111,3, 108,1, 105,8, 65,5, 64,6; HRMS-ESI $[M+H]^+$ hallada 332,0551 [calculada para $C_{16}H_{11}ClFN_3O_2$ 331,0518].

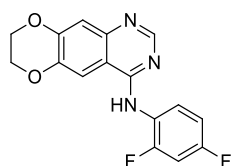
Preparación de JGK005



A una solución de cloroquinazolina **3** fusionada (14 mg, 0,0628 mmol) en CH_3CN (2,0 mL) se le

añadió por goteo 3-etinilanilina (0,05 mL) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 80 °C (temperatura del baño) con agitación durante 12 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 3/1) para proporcionar **JGK005** (10 mg, 52%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,45 (s, 1 H), 8,43 (s, 1 H), 8,04-8,05 (m, 2 H), 7,87-7,90 (m, 1 H), 7,34 (t, J = 7,9 Hz, 1 H), 7,14-7,16 (m, 2 H), 4,35-4,39 (m, 4 H), 4,14 (s, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 156,8, 153,3, 149,5, 146,5, 144,1, 140,2, 129,3, 126,7, 124,9, 122,7, 122,1, 113,0, 110,4, 108,8, 84,0, 80,9, 64,9, 64,6; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 304,1079 [calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ 303,1002].

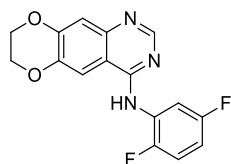
10 **JGK025**



JGK025

La preparación de **JGK025** fue seguida por el procedimiento general; **JGK025** (25%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,30 (s, 1 H), 8,73 (s, 1 H), 8,28 (s, 1 H), 7,51-7,58 (m, 1 H), 7,41-7,48 (m, 1 H), 7,35 (s, 1 H), 7,17-7,23 (m, 1 H), 4,44-4,50 (m, 2 H), 4,39-4,44 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 161,6 (J = 245,9 Hz), 160,0, 157,6 (J = 249,6 Hz), 152,1, 150,1, 145,6, 135,4, 130,4, 121,4, 112,4, 110,9, 108,1, 108,1, 105,4, 65,5, 64,6; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 316,0890 [calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ 315,0813].

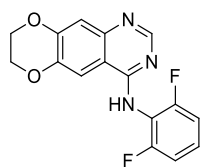
JGK026



JGK026

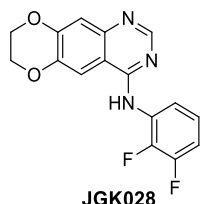
La preparación de **JGK026** fue seguida por el procedimiento general; **JGK026** (22%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,09 (s, 1 H), 8,74 (s, 1 H), 8,18 (s, 1 H), 7,39-7,51 (m, 2 H), 7,30 (s, 1 H), 7,23-7,29 (m, 1 H), 4,45-4,49 (m, 2 H), 4,40-4,44 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 159,8, 158,1 (J = 239,6 Hz), 153,7 (J = 243,2 Hz), 152,1, 150,1, 145,7, 135,7, 126,0, 117,9, 117,8, 116,0, 110,9, 108,2, 106,2, 65,5, 64,6; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 316,0893 [calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ 315,0813].

JGK027

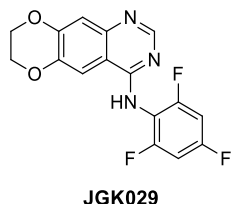


JGK027

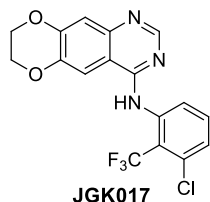
La preparación de **JGK027** fue seguida por el procedimiento general; **JGK027** (6%); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,23 (bs, 1 H), 8,75 (s, 1 H), 8,29 (s, 1 H), 7,91 (s, 1 H), 7,46-7,55 (m, 1 H), 7,29 (t, J = 8,1 Hz, 2 H), 4,46-4,50 (m, 2 H), 4,40-4,46 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 163,6, 160,7, 160,4, 158,4, 152,5, 151,5, 146,2, 130,6, 115,6, 113,5, 113,4, 111,9, 109,3, 108,2, 66,2, 65,3; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 316,0889 [calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ 315,0813].

JGK028

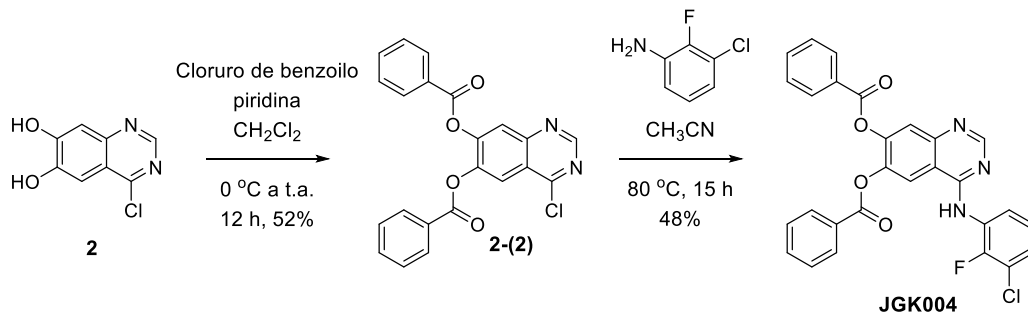
La preparación de **JGK028** fue seguida por el procedimiento general; **JGK028** (41%); ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,64 (s, 1 H), 8,03 (s, 1 H), 7,31-7,38 (m, 2 H), 7,24-7,31 (m, 2 H), 4,50-4,55 (m, 2 H), 4,44-4,50 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 160,1, 152,8, 150,9 ($J = 245,6$ Hz), 149,0, 146,2, 145,9 ($J = 249,7$ Hz), 134,6, 126,0, 124,0, 123,1, 116,2, 109,8, 107,8, 105,0, 65,2, 64,2; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 316,0884 [calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ 315,0813].

JGK029

La preparación de **JGK029** fue seguida por el procedimiento general; **JGK029** (52%); ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 8,60 (s, 1 H), 7,98 (s, 1 H), 7,29 (s, 1 H), 7,07-7,13 (m, 2 H), 4,50-4,53 (m, 2 H), 4,44-4,48 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 161,7, 160,3, 158,6, 158,1, 153,2, 150,3, 144,4, 143,7, 117,2, 113,8, 113,0, 112,3, 109,5, 101,5, 65,3, 64,5; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 334,0794 [calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$ 333,0719].

JGK017

La preparación de **JGK017** fue seguida por el procedimiento general; **JGK017** (5%); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,59 (s, 1 H), 8,15 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H), 7,49 (t, $J = 8,1$ Hz, 1 H), 7,38 (s, 1 H), 7,34 (d, $J = 7,9$ Hz, 1 H), 7,21 (s, 1 H), 4,41-4,42 (m, 2 H), 4,38-4,40 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 156,4, 153,2, 149,7, 146,7, 144,5, 138,4, 133,5, 132,2, 128,2, 125,4, 119,9, 119,7, 114,3, 110,4, 105,7, 64,5, 64,3.

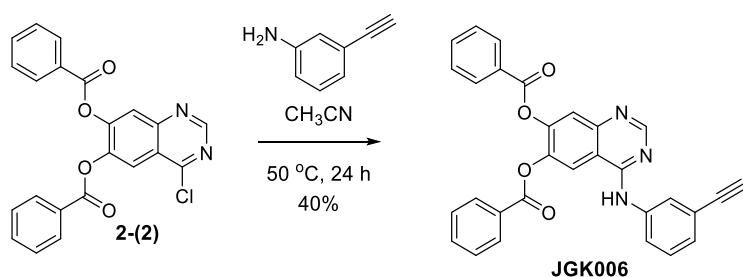
Preparación de JGK004

[Benzoilación] A una solución enfriada (0 °C) de diol **2** (205 mg, 1,0428 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5,2 mL, 0,2 M) se le añadió por goteo sucesivamente piridina (0,5 mL) y cloruro de benzoilo (0,7 mL) bajo Ar. Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 h, la mezcla de reacción se inactivó con NH_4Cl acuoso saturado (20 mL) y se diluyó con CH_2Cl_2 (20 mL). Se

separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2×50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H_2O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/ EtOAc , 10/1) para proporcionar benzoil cloroquinazolina **2-(2)** (220 mg, 52%); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,07 (s, 1 H), 8,31 (s, 1 H), 8,16 (s, 1 H), 8,04-8,07 (m, 4 H), 7,53-7,58 (m, 2 H), 7,34-7,39 (m, 4 H).

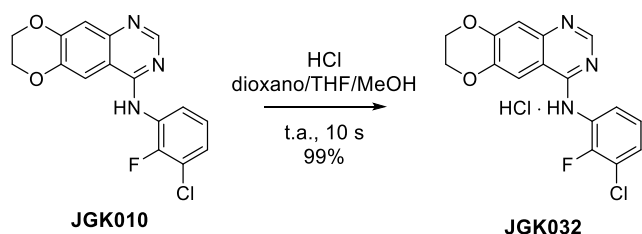
[JGK004] A una solución de benzoil cloroquinazolina **2-(2)** (180 mg, 0,444 mmol) en CH_3CN (3,0 mL) se le añadió por goteo 3-cloro-2-fluoroanilina (0,06 mL, 0,533 mmol) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 80°C (temperatura del baño) con agitación durante 15 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/ EtOAc , 3/1) para proporcionar **JGK004** (109 mg, 48%); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,85 (s, 1 H), 8,48-8,53 (m, 1 H), 8,08 (t, $J = 7,2$ Hz, 4 H), 7,99 (d, $J = 3,2$ Hz, 2 H), 7,51-7,59 (m, 3 H), 7,39 (dd, $J = 8,4$, 16,0 Hz, 4 H), 7,16-7,21 (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 164,2, 163,7, 156,6, 155,1, 150,6, 149,1, 148,6, 147,5, 142,1, 134,1, 134,1, 130,3, 130,2, 128,6, 128,6, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 125,3, 124,6, 124,5, 122,9, 121,6, 121,0, 120,9, 114,4, 113,3; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 514,0963 [calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{O}_4$ 513,0886].

Preparación de JGK006



A una solución de benzoil cloroquinazolina **2-(2)** (100 mg, 0,247 mmol) en CH_3CN (3,0 mL) se le añadió por goteo 3-etinilanilina (0,05 mL, 0,430 mmol) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 50°C (temperatura del baño) con agitación durante 24 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/ EtOAc , 4/1) para proporcionar **JGK006** (48 mg, 40%); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,71 (s, 1 H), 8,03 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H), 7,96 (s, 1 H), 7,90-7,95 (m, 2 H), 7,79 (s, 1 H), 7,62-7,75 (m, 3 H), 7,55 (t, $J = 7,3$ Hz, 1 H), 7,48 (t, $J = 7,5$ Hz, 1 H), 7,37 (t, $J = 7,4$ Hz, 2 H), 7,22-7,31 (m, 4 H), 3,04 (s, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 164,8, 163,9, 156,7, 155,3, 148,9, 146,9, 141,3, 138,1, 134,1, 134,0, 130,3, 130,1, 128,9, 128,6, 128,5, 128,1, 128,0, 127,9, 124,8, 122,7, 122,4, 122,1, 115,1, 113,1, 83,3; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 486,1443 [calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ 485,1370]

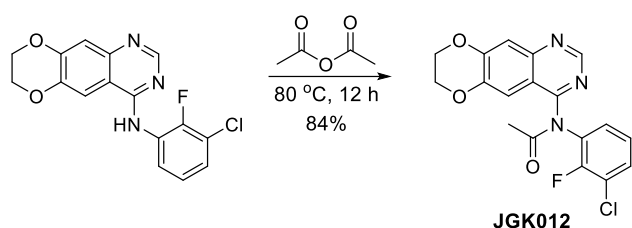
Preparación de JGK032



Se generó una solución de cloruro de hidrógeno 1,0 M mediante la adición de una solución de cloruro de hidrógeno (0,1 mL, 4,0 M en dioxano, 0,4 mmol) a THF (0,3 mL) a temperatura

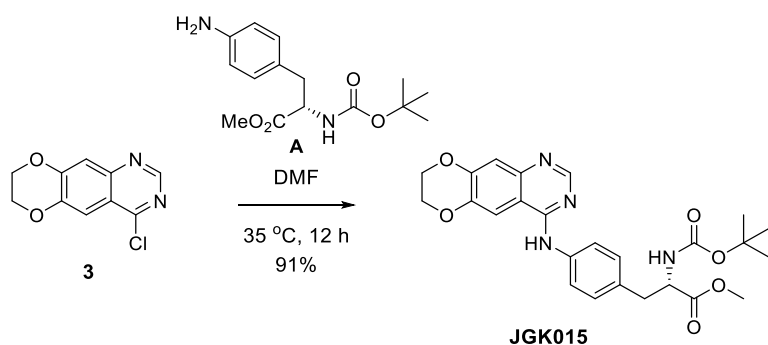
ambiente. A una solución de **JGK010** (6,1 mg, 0,01839 mmol) en MeOH se le añadió por goteo la solución de cloruro de hidrógeno generada anteriormente (0,030 mL, 0,030 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a la misma temperatura durante 10 segundos, la mezcla de reacción se concentró al vacío para proporcionar **JGK032** (6,7 mg, 99%); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,63 (s, 1 H), 8,81 (s, 1 H), 8,36 (s, 1 H), 7,63 (ddd, J = 1,6, 6,9, 8,3 Hz, 1 H), 7,39 (s, 1 H), 7,35 (ddd, J = 1,1, 8,1, 16,2 Hz, 1 H), 4,49-4,51 (m, 2 H), 4,43-4,45 (m, 2 H).

Preparación de JGK012



A un sólido de **JGK010** (39 mg, 0,1176 mmol) se le añadió anhídrido acético (5,0 mL). Después de calentarla a 80 °C (temperatura del baño) con agitación durante 12 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se neutralizó con NaHCO_3 acuoso saturado (20 mL) y se diluyó con EtOAc (20 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H_2O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 2/1 a 1/1) para proporcionar **JGK012** (37 mg, 84% de rendimiento aislado); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9,01 (s, 1 H), 7,49 (s, 1 H), 7,44 (s, 1 H), 7,31-7,41 (m, 2 H), 7,09 (t, J = 8,0 Hz, 1 H), 4,41-4,43 (m, 2 H), 4,37-4,40 (m, 2 H), 2,15 (s, 3 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170,2, 159,2, 153,3, 151,3, 149,7, 145,8, 130,6, 129,8, 129,7, 124,7, 122,5, 122,4, 117,7, 113,6, 109,2, 64,5, 64,2, 22,9; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 374,0701 [calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClFN}_3\text{O}_3$ 373,0623].

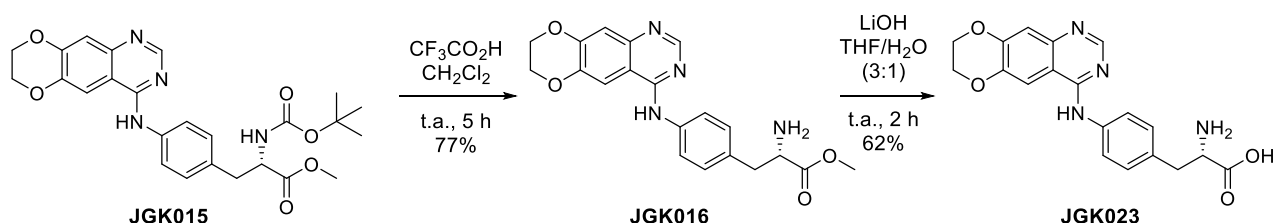
Preparación de JGK015



A una solución del análogo de L-aminoácido **A** (227 mg, 0,7712 mmol) en DMF (3,0 mL) se le añadió en una parte cloroquinazolina **3** fusionada (117 mg, 0,5932 mmol) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 35 °C (temperatura del baño) con agitación durante 12 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con salmuera saturada (30,0 mL) y EtOAc (30,0 mL) para proporcionar una suspensión amarilla. Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). Se concentraron al vacío las capas orgánicas combinadas. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 40/1 a 10/1) para proporcionar **JGK015** (261 mg, 92%); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,57 (s, 1 H), 7,64 (s, 1 H), 7,61 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 7,37 (s, 1 H), 7,27 (s, 1 H), 7,08

(d, $J = 8,5$ Hz, 2 H), 5,09 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H), 4,54 (dd, $J = 6,0, 13,5$ Hz, 1 H), 4,31-4,33 (m, 2 H), 4,27-4,29 (m, 2 H), 3,68 (s, 3 H), 3,06 (dd, $J = 5,6, 14,0$ Hz, 1 H), 3,00 (dd, $J = 6,1, 13,8$ Hz, 1 H), 1,39 (s, 9 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 172,4, 156,5, 155,2, 153,6, 149,1, 146,3, 143,8, 137,6, 131,6, 129,7, 121,7, 113,8, 110,3, 106,6, 80,0, 64,4, 64,2, 54,4, 52,2, 37,6, 28,3; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 481,2082 [calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$ 480,2003].

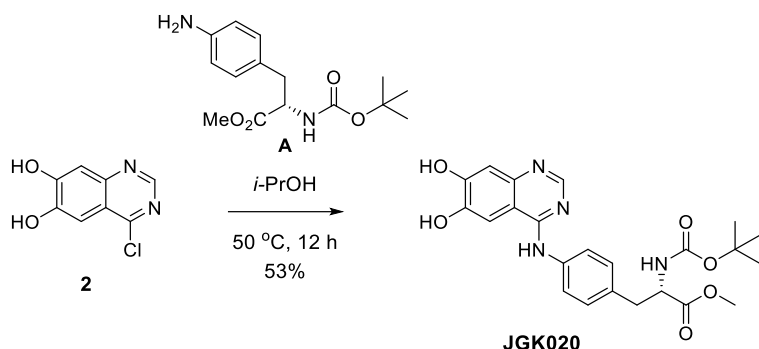
Preparación de JGK016, JGK023



[JGK016 (desprotección de Boc)] A una solución de **JGK015** (121 mg, 0,251 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL, 0,05 M) se le añadió por goteo ácido trifluoroacético (1,0 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar a la misma temperatura durante 5 h, la mezcla de reacción se inactivó con NaHCO_3 acuoso saturado (20 mL) y se diluyó con CH_2Cl_2 (20 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2×30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H_2O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20/1) para proporcionar **JGK016** (74 mg, 77%); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,5 (s, 1 H), 8,68 (s, 1 H), 8,43 (s, 2 H), 8,20 (s, 1 H), 7,68 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,26 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,23 (s, 1 H), 4,44-4,46 (m, 2 H), 4,39-4,41 (m, 2 H), 3,68 (s, 3 H), 3,03-3,13 (m, 2 H); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8,26 (s, 1 H), 7,73 (s, 1 H), 7,60 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,17 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,08 (s, 1 H), 4,31-4,35 (m, 4 H), 3,72 (t, $J = 6,6$ Hz, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,27-3,29 (m, 1 H), 3,01 (dd, $J = 5,9, 13,6$ Hz, 1 H), 2,89 (dd, $J = 7,0, 13,5$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174,4, 157,4, 152,6, 149,7, 145,0, 144,2, 137,5, 132,8, 129,2, 122,8, 122,3, 111,5, 110,1, 107,9, 64,5, 64,1, 55,2, 51,0, 39,5; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 381,1553 [calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$ 380,1479].

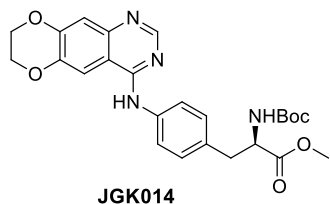
[JGK023 (hidrólisis)] A una solución enfriada (0°C) de **JGK016** (42 mg, 0,1104 mmol) en $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1, total 4,0 mL) se le añadió en una parte hidróxido de litio (14 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla de reacción se neutralizó con HCl 1 N y se diluyó con EtOAc (20 mL). Se separaron las capas y se extrajo la capa acuosa con EtOAc (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H_2O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 30/1 a 15/1) para proporcionar **JGK023** (25 mg, 62%); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,62 (s, 1 H), 8,12 (s, 1 H), 7,71 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,40 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,24 (s, 1 H), 4,48-4,50 (m, 2 H), 4,42-4,44 (m, 2 H), 4,28 (t, $J = 6,8$ Hz, 1 H), 3,32-3,37 (m, 1 H), 3,20 (dd, $J = 7,6, 14,8$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 169,7, 159,1, 152,4, 148,8, 146,0, 136,1, 134,1, 133,1, 129,7, 129,7, 124,8, 124,8, 110,0, 108,1, 104,9, 65,2, 64,2, 53,6, 35,4; HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ hallada 367,1334 [calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$ 366,1322].

Preparación de JGK020



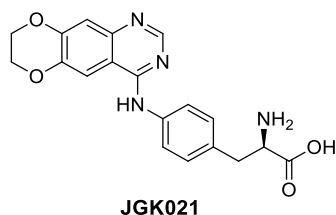
A una solución de cloroquinazolina **2** (104 mg, 0,5294 mmol) en alcohol isopropílico (5,3 mL) se le añadió por goteo aminoácido (187 mg) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 50 °C (temperatura del baño) con agitación durante 12 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 5/1 a 3/1) para proporcionar **JGK020** (128 mg, 53%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,68 (s, 1 H), 10,22 (br, 1 H), 8,64 (s, 1 H), 7,91 (s, 1 H), 7,53 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,26-7,31 (m, 4 H), 4,12-4,18 (m, 1 H), 3,59 (s, 3 H), 2,98 (dd, *J* = 5,2, 14,0 Hz, 1 H), 2,84 (dd, *J* = 10,0, 13,2 Hz, 1 H), 1,30 (s, 9 H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173,0, 158,2, 155,9, 155,6, 148,7, 148,4, 136,1, 135,8, 129,7, 124,7, 107,6, 107,3, 103,3, 78,8, 55,7, 52,3, 36,3, 28,6; HRMS-ESI [*M*+*H*]⁺ hallada 455,1920 [calculada para C₂₃H₂₆N₄O₆ 454,1846].

JGK014



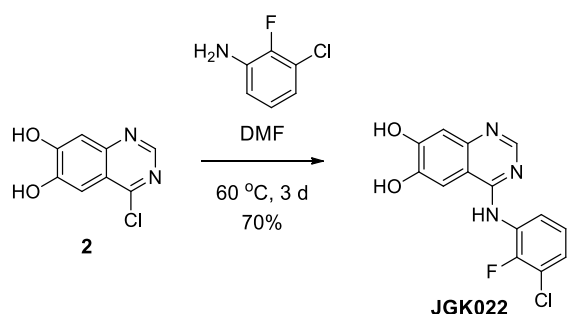
JGK014 (26%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,62 (s, 1 H), 7,66 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,35 (s, 1 H), 7,16 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 4,99 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 4,56-4,62 (m, 1 H), 4,36-4,42 (m, 4 H), 3,73 (s, 3 H), 3,03-3,15 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172,4, 156,5, 155,2, 153,6, 149,1, 146,3, 143,8, 137,6, 131,6, 129,7, 121,7, 113,8, 110,3, 106,6, 80,0, 64,4, 64,2, 54,4, 52,2, 37,6, 28,3; HRMS-ESI [*M*+*H*]⁺ hallada 481,2080 [calculada para C₂₅H₂₈N₄O₆ 480,2003].

JGK021



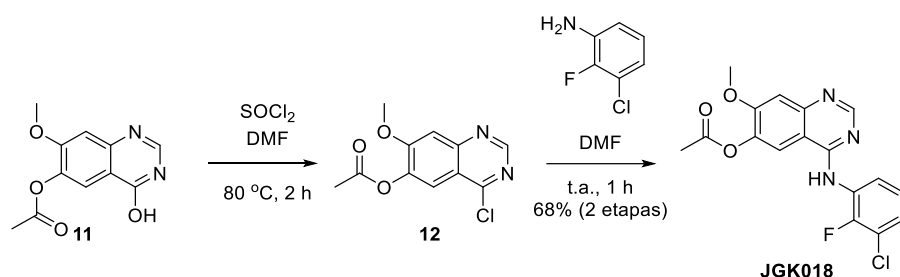
La preparación de **JGK021** fue seguida por el procedimiento sintético de **JGK023**; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,62 (s, 1 H), 8,12 (s, 1 H), 7,71 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,40 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,24 (s, 1 H), 4,48-4,50 (m, 2 H), 4,42-4,44 (m, 2 H), 4,28 (t, *J* = 6,8 Hz, 1 H), 3,32-3,37 (m, 1 H), 3,20 (dd, *J* = 7,6, 14,8 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169,7, 159,1, 152,4, 148,8, 146,0, 136,1, 134,1, 133,1, 129,7, 129,7, 124,8, 124,8, 110,0, 108,1, 104,9, 65,2, 64,2, 53,6, 35,4; HRMS-ESI [*M*+*H*]⁺ hallada 367,1347 [calculada para C₁₉H₁₈N₄O₄ 366,1322].

Preparación de JGK022



A una solución de diol **X** (121 mg, 0,6155 mmol) en DMF (3,0 mL) se le añadió por goteo 3-cloro-2-fluoroanilina (0,14 mL) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 60 °C (temperatura del baño) con agitación durante 3 d, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con Et₂O (30,0 mL) para proporcionar una suspensión blanca. El sólido blanco resultante se lavó sucesivamente con Et₂O (3 x 50 mL) y CH₂Cl₂ (2 x 30 mL) y se recogió para proporcionar **JGK022** (132 mg, 70%); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,16 (br, 1 H), 10,43 (br, 1 H), 8,68 (s, 1 H), 7,91 (s, 1 H), 7,58 (t, *J* = 7,1 Hz, 1 H), 7,48 (t, *J* = 6,8 Hz, 1 H), 7,40 (s, 1 H), 7,30 (t, *J* = 8,1 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,1, 156,4, 154,1, 152,1, 149,1, 148,3, 135,1, 129,7, 128,1, 126,8, 125,7, 120,8, 107,4, 106,9, 102,9; HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 306,0437 [calculada para C₁₄H₉ClFN₃O₂ 305,0361].

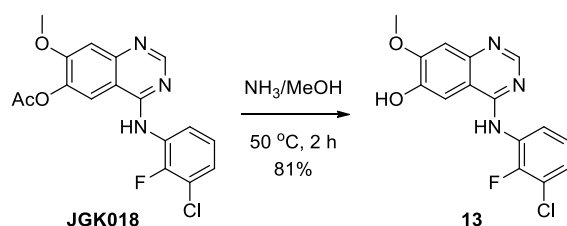
Preparación de JGK018



[Cloración] A una solución de **11** (500 mg, 2,134 mmol) en cloruro de tionilo (7,5 mL, 0,28 M) se le añadió por goteo dimetilformamida (0,15 mL). Después de calentarla a 80 °C (temperatura del baño) con agitación durante 2 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se lavó sucesivamente con Et₂O (200 mL) y se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

[Sustitución] A una solución de cloroquinazolina **12** generada anteriormente en DMF anhidra (11 mL, 0,2 M) se le añadió por goteo 3-cloro-2-fluoroanilina (0,50 mL, 4,548 mmol) a temperatura ambiente bajo Ar. Después de agitar a la misma temperatura durante 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con Et₂O (100,0 mL) para proporcionar una suspensión blanca. El sólido blanco resultante se lavó sucesivamente con Et₂O (2 x 50 mL) y se recogió para proporcionar **JGK018** (525 mg, 68%); los datos espectroscópicos se compararon con Zhang, X. et ál. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 8200-8215.

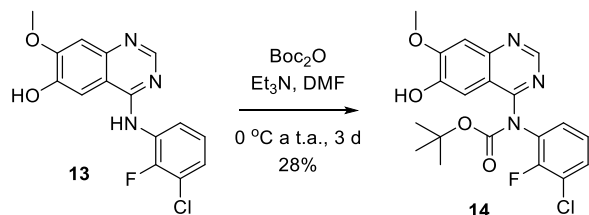
Preparación de 13



[Desprotección de acetilo] A **JGK018** (550 mg, 1,520 mmol) se le añadió por goteo una solución de amoníaco (8,0 mL, 7 N en metanol). Después de calentarla a 50 °C (temperatura

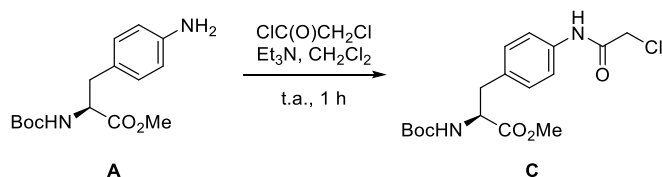
del baño) en un tubo sellado con agitación durante 2 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El sólido blanco resultante se lavó sucesivamente con Et₂O (2 x 50 mL) y se recogió para proporcionar **13** (394 mg, 81%); los datos espectroscópicos se compararon con Zhang, X. et ál. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 8200-8215.

5 Preparación de 14



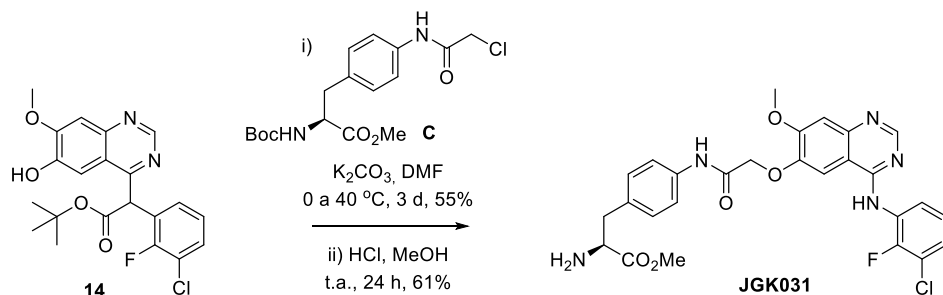
A una solución enfriada ($0\text{ }^\circ\text{C}$) de **13** (113 mg, 0,353 mmol) en DMF anhidro (2 mL) se le añadió por goteo trietilamina (0,25 mL, 1,767 mmol) seguida de la adición por goteo de dicarbonato de di-*tert*-butilo (62 mg, 0,459 mmol) en DMF anhidra (2 mL) bajo Ar. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 d, la mezcla de reacción se inactivó con H₂O acuoso saturado (10 mL) y se diluyó con EtOAc (10 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 5/1 a 3/1) para proporcionar **14** (42 mg, 28% de rendimiento aislado); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,69 (s, 1 H), 8,39-8,45 (m, 1 H), 7,64 (s, 1 H), 7,44 (s, 1 H), 7,11-7,16 (m, 2 H), 3,90 (s, 3 H), 1,59 (s, 9 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156,2 ($J = 39,5$ Hz), 154,9, 151,3, 150,3, 149,5 ($J = 224,1$ Hz), 140,4, 128,1 ($J = 9,6$ Hz), 124,8, 124,4 ($J = 4,8$ Hz), 121,5, 120,8 ($J = 51,2$ Hz), 113,5, 109,0, 108,8, 84,6, 56,2, 27,6;

20 Preparación de C



A una solución de **A**¹ (56 mg, 0,1904 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL) se le añadió por goteo trietilamina (0,08 mL, 0,5712 mmol) seguida de la adición de cloruro de cloroacetilo (0,05 mL, 0,6286 mmol) a temperatura ambiente bajo Ar. Después de agitar a la misma temperatura durante 1 h, la mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl acuoso saturado (20 mL) y se diluyó con CH₂Cl₂ (20 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El producto bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

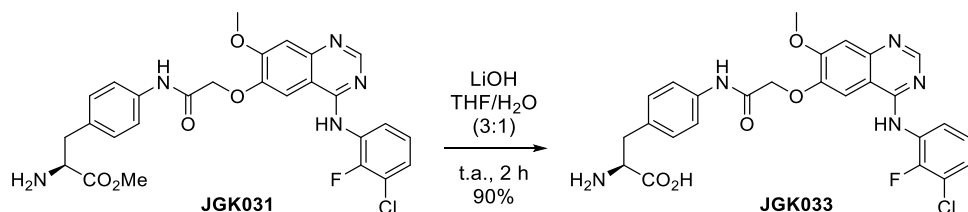
30 Preparación de JGK031



[Alquilación] A una solución enfriada (0 °C) de **14** (44 mg, 0,1058 mmol) en DMF (2,0 mL) se añadió en una parte carbonato de potasio (73 mg, 0,528 mmol) seguido de la adición por goteo de **C** (0,1904 mmol) en DMF (2,0 mL) a temperatura ambiente. Después de calentarla a 40 °C (temperatura del baño) con agitación durante 3 d, la mezcla de reacción se inactivó con H₂O (10 mL) y se diluyó con EtOAc (10 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 100/1 a 30/1) para proporcionar un producto alquilado **14-(2)** (43 mg, 55% de rendimiento aislado); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (s, 1 H), 7,48 (d, *J* = 8,4 Hz, 2 H), 7,44 (s, 1 H), 6,98-7,13 (m, 5 H), 6,34 (m, 1 H), 4,95 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H), 4,54 (d, *J* = 6,5 Hz, 1 H), 4,48 (s, 2 H), 3,69 (s, 6 H), 2,95-3,13 (m, 2 H), 1,53 (s, 9 H), 1,40 (s, 9 H).

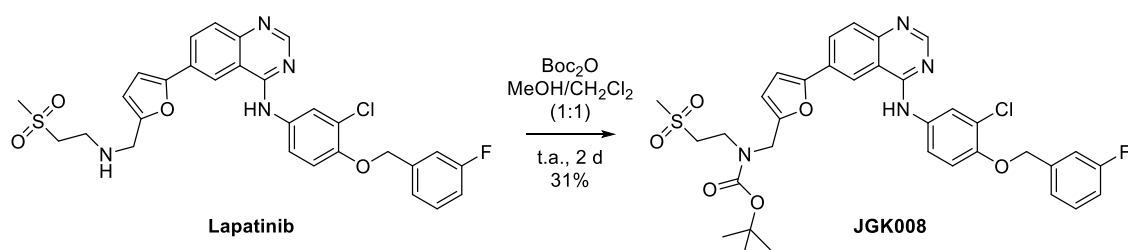
[Desprotección] A una solución del producto alquilado **14-(2)** (26 mg, 0,0348 mmol) en MeOH anhidro (5,0 mL) se le añadió por goteo una solución de clorhidrato 0,5 N (0,5 mL). Después de agitarla a la misma temperatura durante 24 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice de fase inversa, MeOH or MeOH/H₂O, 10/1) para proporcionar **JGK031** (12 mg, 61%); ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,20 (s, 1 H), 7,67 (s, 1 H), 7,49 (t, *J* = 7,9 Hz, 2 H), 7,24-7,30 (m, 1 H), 7,11-7,21 (m, 4 H), 3,94 (s, 3 H), 3,59 (s, 3 H), 2,83-3,01 (m, 2 H); HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 554,1631 [calculada para C₂₇H₂₅ClFN₅O₅ 553,1522].

Preparación de JGK033



A una solución de **JGK031** (5 mg, 0,009026 mmol) en THF anhidro (6 mL) y H₂O (2 mL) se le añadió hidróxido de litio·H₂O (3 mg) en una parte. Después de agitarla a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla de reacción se neutralizó con solución de clorhidrato 1 N y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna inversa (gel de sílice de fase inversa, MeOH/H₂O, 5/1) para proporcionar **JGK033** (4,4 mg, 90%); ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7,16 (s, 1 H), 6,32 (s, 1 H), 6,03 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H), 5,89-5,98 (m, 2 H), 5,59-5,79 (m, 4 H), 4,00 (s, 2 H), 2,51 (s, 3 H), 2,46 (t, *J* = 5,6 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ 163,9, 159,4, 157,2, 154,3, 152,1, 149,5, 137,1, 135,4, 129,7, 126,9, 124,6, 121,5, 120,3, 108,0, 106,9, 97,8, 56,6, 53,5, 35,6; HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 540,1435 [calculada para C₂₆H₂₃ClFN₅O₅ 539,1366].

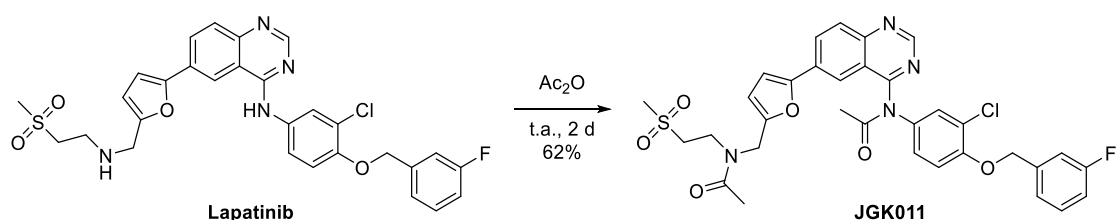
Preparación de JGK008



A una solución de lapatinib (326 mg, 0,561 mmol) en MeOH anhidro (5,6 mL) y CH₂Cl₂ (5,6 mL)

se le añadió por goteo dicarbonato de di-*terc*-butilo (378 mg, 2,819 mmol) en una parte bajo Ar. Después de agitarla a temperatura ambiente durante 2 d, la mezcla de reacción se inactivó con H₂O acuoso saturado (10 mL) y se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (5 × 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con H₂O y salmuera saturada, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 3/1 a 1/1) para proporcionar **JGK008** (119 mg, 31% de rendimiento aislado); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,71 (bs, 1 H), 8,64 (s, 1 H), 8,44 (s, 1 H), 7,85-7,95 (m, 3 H), 7,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,32-7,37 (m, 1 H), 7,21 (dd, *J* = 8,4, 10,8 Hz, 2 H), 6,98-7,03 (m, 1 H), 6,96 (d, *J* = 8,9 Hz, 1 H), 6,39 (d, *J* = 47,1 Hz, 1 H), 5,13 (s, 2 H), 4,53 (d, *J* = 32,2 Hz, 2 H), 3,99 (t, *J* = 7,3 Hz, 2 H), 3,39 (d, *J* = 66,1 Hz, 2 H), 2,89 (s, 3 H), 1,49 (s, 9 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 163,9, 162,0, 158,0, 154,2, 152,7, 151,7, 151,0, 139,1 (d, *J* = 7,3 Hz), 132,4, 130,1 (d, *J* = 8,1 Hz), 129,1, 128,6, 128,2, 125,1, 123,1, 122,4, 122,3, 115,4, 114,9 (d, *J* = 21,0 Hz), 114,1 (d, *J* = 13,9 Hz), 113,9, 111,5, 110,9, 107,7, 81,3, 70,9, 45,0, 43,6, 42,3, 41,4, 41,2, 28,4; HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 681,1946 [calculada para C₃₄H₃₄ClFN₄O₆S 680,1866].

Preparación de JGK011



A un sólido de lapatinib (68 mg, 0,353 mmol) se le añadió anhídrido acético (5,0 mL) bajo Ar. Después de agitarla a temperatura ambiente durante 2 d, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/EtOAc, 3/1 a 1/3) para proporcionar **JGK002** (48 mg, 62% de rendimiento aislado); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9,18 (s, 1 H), 8,10-8,17 (m, 3 H), 7,50 (d, *J* = 2,5 Hz, 1 H), 7,27-7,36 (m, 2 H), 7,18 (dd, *J* = 7,6, 13,8 Hz, 2 H), 6,97-7,03 (m, 2 H), 6,79 (d, *J* = 3,3 Hz, 1 H), 6,44 (d, *J* = 3,3 Hz, 1 H), 5,14 (s, 2 H), 4,66 (s, 2 H), 3,86 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H), 3,30 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H), 2,95 (s, 3 H), 2,33 (s, 3 H), 2,23 (s, 3 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171,4, 171,2, 163,9, 162,2, 162,0, 154,0, 153,7, 152,5, 151,0, 138,5 (*J* = 7,3 Hz), 134,2, 130,8, 130,3, 130,2, 129,9, 129,1, 127,4, 123,9, 122,4 (*J* = 2,9 Hz), 121,8, 118,0, 115,1, 115,0, 114,0 (*J* = 5,2 Hz), 113,8, 111,1, 108,9, 70,1 (*J* = 1,7 Hz), 52,3, 47,0, 41,4, 40,7, 23,7, 21,8; HRMS-ESI [M+H]⁺ hallada 665,1628 [calculada para C₃₃H₃₀ClFN₄O₆S 664,1553].

Ejemplo 2: Preparación de compuestos ilustrativos adicionales de la serie JGK

Información química general

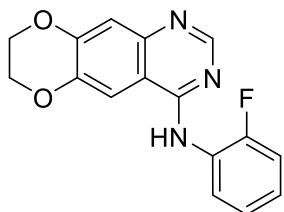
Todos los químicos, reactivos y solventes se adquirieron de fuentes comerciales cuando estuvieran disponibles y se utilizaron tal cual se recibieron. Cuando fue necesario, los reactivos y solventes se purificaron y secaron mediante métodos estándar. Las reacciones sensibles al aire y a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera inerte de argón en material de vidrio secado al horno. Las reacciones irradiadas con microondas se llevaron a cabo en un sintetizador de microondas CEM Discover de reactor de modo simple. Las reacciones a temperatura ambiente se llevaron a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Todas las

reacciones se controlaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ precubiertas, donde las manchas se visualizaron mediante luz UV ($\lambda = 254, 365$ nm) o mediante el uso de una solución de KMnO₄ alcalina. La cromatografía en columna ultrarrápida (FC) se llevó a cabo en SiO₂ 60 (tamaño de partícula 0,040–0,063 mm, 230–400 mesh). La concentración a presión reducida (al vacío) se realizó mediante evaporación rotatoria a 25–50 °C. Los compuestos purificados se secaron adicionalmente al alto vacío o en un desecador. Los rendimientos corresponden a compuestos purificados y no se optimizaron adicionalmente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (que funcionan a 300, 400 o 500 MHz). Los espectros de NMR de carbono (¹³C RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (ya sea a 400 ó 500 MHz). Los desplazamientos químicos de NMR (δ ppm) se referenciaron a las señales de solvente residual. Los datos de ¹H NMR se informan como sigue: desplazamiento químico en ppm; multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, quint = quinteto, m = multiplete/patrón complejo, td = triplete de dobletes, ddd = doblete de doblete de dobletes, br = señal amplia); constantes de acoplamiento (J) en Hz, integración. Los datos para espectros de ¹³C NMR se informan en términos de desplazamiento químico y de constantes de acoplamiento aplicables. Los datos de espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrometro de masas Thermo Fisher Scientific Exactive Plus con fuente IonSense ID-CUBE DART. Los compuestos 4-cloro-7,8-dihidro[1,4] dioxino[2,3-g]quinazolina (1), 4-cloroquinazolina-6,7-diol (2) y JGK010 se prepararon como se informó anteriormente.

Procedimiento general A para la síntesis de compuestos de 4-anilinoquinazolina JGK035–JGK041 y JGK043.

Se trató una mezcla de 4-cloroquinazolina (1 equiv.) en *i*PrOH (0,1 a 0,3 M) con la anilina (1 equiv.) y la mezcla se calentó a 80 °C con irradiación de microondas (60 W) durante 15-20 min. La mezcla se enfrió hasta 23 °C, se trató con anilina adicional (1 equiv.) y se sometió nuevamente a irradiación de microondas (80 °C, 60 W, 15-20 min). La mezcla se concentró a presión reducida o la sal de clorhidrato de 4-anilinoquinazolina precipitada se aisló por filtración (lavados con *i*PrOH frío). El residuo se suspendió en NaHCO₃ ac. sat. y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, salmuera, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. La purificación por FC (elución con un gradiente de CH₂Cl₂/EtOAc o hexanos/EtOAc) proporcionó los productos deseados típicamente como sólidos de color blanco a blancuzco o amarillo pálido.

***N*-(2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK035).**

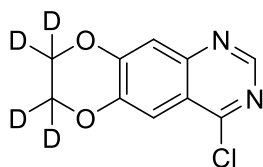


Siguiendo el procedimiento general A, se preparó el compuesto JGK035 a partir de 4-cloroquinazolina 1 (51 mg, 0,23 mmol) y 2-fluoroanilina (40 μ L, 0,48 mmol) en *i*PrOH (1,5 mL). FC (CH₂Cl₂/EtOAc 10:1 $\rightarrow$ 10:4) proporcionó JGK035 (56 mg, 82%) como un sólido blanco. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,68 (s, 1H), 8,64 (td, *J* = 8,2, 1,7 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,36 (br, 1H),

7,31 (s, 1H), 7,22 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,17 (ddd, $J = 11,2, 8,3, 1,5$ Hz, 1H), 7,10 – 7,05 (m, 1H), 4,44 – 4,37 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 156,08, 153,60, 153,50 (d, $J = 242,7$ Hz), 149,52, 146,65, 144,34, 127,31 (d, $J = 9,5$ Hz), 124,66 (d, $J = 3,7$ Hz), 123,97 (d, $J = 7,8$ Hz), 122,89, 115,06 (d, $J = 19,3$ Hz), 114,46, 110,62, 106,10, 64,69, 64,51 ppm. HRMS (DART):

5 m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{FN}_3\text{O}_2^-$, 296,0841; hallada, 296,0841.

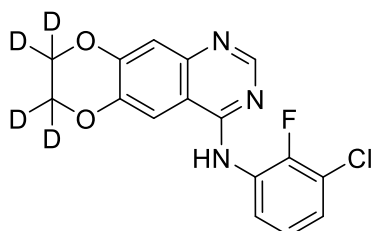
4-cloro(7,7,8,8- $^2\text{H}_4$)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolina (3).



Una solución del compuesto 2 (193 mg, 0,98 mmol) en DMF seca (4,8 mL) se trató con Cs_2CO_3 (788 mg, 2,42 mmol), se agitó durante 5 min y se trató por goteo con 1-bromo-2-cloro($^2\text{H}_4$)etano (270 μL , 3,16 mmol). La mezcla se agitó a 23 $^\circ\text{C}$ durante 1 h y entonces se agitó a 70 $^\circ\text{C}$ durante 18 h. Después de que la mezcla se enfriara hasta 23 $^\circ\text{C}$, todos los volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (40 mL), se lavó con agua (2 x 13 mL), salmuera (13 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 1:0 $\rightarrow$ 10:1,5) proporcionó el compuesto del título 3 (109 mg, 49%) como un sólido blanco esponjoso.

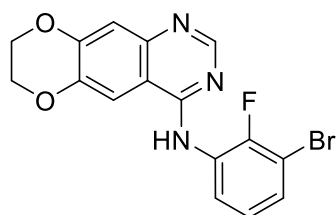
15 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,84 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,47 ppm (s, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 160,19, 152,52, 151,54, 147,93, 146,06, 120,10, 113,72, 110,83 ppm (dos carbonos de campo opuesto no observados). HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{D}_4\text{ClN}_2\text{O}_2^+$, 227,0520; hallada, 227,0516.

***N*-(3-cloro-2-fluorofenil)(7,7,8,8- $^2\text{H}_4$)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amino (JGK036).**



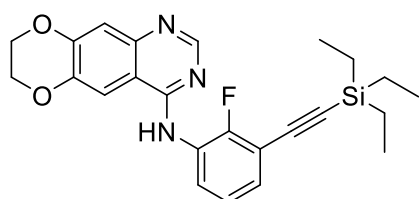
Siguiendo el procedimiento general A, se preparó el compuesto JGK036 a partir de 4-cloroquinazolina 3 (55 mg, 0,24 mmol) y 3-cloro-2-fluoroanilina (52 μL , 0,47 mmol) en *i*PrOH (1,2 mL). JGK036•Se aisló HCl mediante filtración de la mezcla de reacción en bruto y, después de la basificación y extracción, se obtuvo JGK036 puro (67 mg, 82%) en forma de un sólido de color amarillo pálido. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,62 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,53 – 7,43 (m, 2H), 7,27 (td, $J = 8,1, 1,3$ Hz, 1H), 7,19 ppm (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,17, 153,10, 152,45 (d, $J = 249,2$ Hz), 149,28, 146,04, 143,68, 128,21 (d, $J = 12,0$ Hz), 127,27, 127,03, 124,87 (d, $J = 4,7$ Hz), 120,11 (d, $J = 16,7$ Hz), 112,48, 109,64, 108,35, 63,50 (m, 2C's). HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{D}_4\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$, 336,0848; hallada, 336,0841.

***N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK037).**



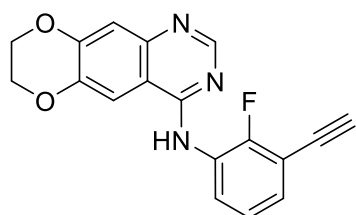
Siguiendo el procedimiento general A, se preparó el compuesto JGK037 a partir de 4-cloroquinazolina 1 (100 mg, 0,45 mmol) y 3-bromo-2-fluoroanilina (100 μ L, 0,89 mmol) en *i*PrOH (1,5 mL). FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 10:0 $\rightarrow$ 10:3) proporcionó JGK037 (150 mg, 89%) como un sólido amarillo pálido. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,68 (s, 1H), 8,65 (ddd, J = 8,3, 7,4, 1,5 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,35 (br, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,29 – 7,24 (m, 1H), 7,11 (td, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,44 – 4,38 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 155,89, 153,37, 150,15 (d, J = 242,2 Hz), 149,70, 146,75, 144,53, 128,65 (d, J = 10,5 Hz), 127,24, 125,31 (d, J = 4,7 Hz), 121,79, 114,53, 110,59, 108,59 (d, J = 19,4 Hz), 105,93, 64,70, 64,51 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{BrFN}_3\text{O}_2^-$, 373,9946; hallada, 373,9946.

***N*-{2-Fluoro-3-[(trietilsilil)etnil]fenil}-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (4).**



Se cargó un vial de 1 dram con JGK010 (75 mg, 0,23 mmol), XPhos (19,7 mg, 0,041 mmol), Cs_2CO_3 (195 mg, 0,60 mmol), $[\text{PdCl}_2 \cdot (\text{MeCN})_2]$ (3,6 mg, 0,014 mmol). El vial se evacuó y se volvió a llenar con argón (se repitió al menos dos veces). Se añadió acetonitrilo seco (1 mL) y la suspensión naranja se agitó a 23 °C durante 25 min, luego se inyectó etiniltrietilsilano (150 μ L, 0,84 mmol). El tubo se selló y la mezcla de reacción se agitó a 95 °C en un baño de aceite precalentado durante 3,5 h. La suspensión se dejó alcanzar 23 °C, se diluyó con EtOAc, se filtró a través de un tapón de SiO_2 (lavados con EtOAc) y se evaporó. La purificación mediante FC(SiO_2 :hexanos/EtOAc 8:2 $\rightarrow$ 4:6) proporcionó el compuesto del título 4 (48 mg, 49%) como un sólido espumoso amarillo. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,681 (td, J = 8,1, 1,9 Hz, 1H), 8,678 (s, 1H), 7,382 (s, 1H), 7,376 (br, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,21 – 7,12 (m, 2H), 4,44 – 4,38 (m, 4H), 1,07 (t, J = 7,9 Hz, 9H), 0,71 ppm (q, J = 7,9 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 155,95, 153,81 (d, J = 248,0 Hz), 153,44, 149,62, 146,66, 144,47, 127,68, 127,60, 124,15 (d, J = 4,5 Hz), 122,79, 114,49, 111,77 (d, J = 14,6 Hz), 110,61, 105,97, 98,65, 98,49 (d, J = 3,7 Hz), 64,70, 64,51, 7,63, 4,50 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}^+$, 436,1851; hallada, 436,1831.

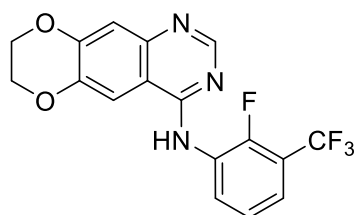
***N*-(3-etnil-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK038).**



Una mezcla de compuesto 4 (40 mg, 0,09 mmol) en THF húmedo (0,9 mL) se trató por goteo con una solución 1 M de TBAF en THF (450 μ L, 0,45 mmol) y la mezcla se agitó a 23 °C durante 18 h. Se agregó agua (10 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 $\times$ 15 mL). Los orgánicos

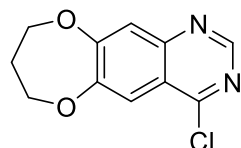
combinados se lavaron con salmuera (20 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron. La purificación por FC (SiO₂; hexanos/EtOAc 7:3 → 3:7), seguida de una segunda FC (SiO₂; CH₂Cl₂/EtOAc 1:0 → 6:4) proporcionó JGK038 (19 mg, 64%) como un sólido blancuzco. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,69 (td, J = 8,0, 1,8 Hz, 1H), 8,67 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,36 (br, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,24 – 7,15 (m, 2H), 4,43 – 4,38 (m, 4H), 3,34 ppm (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 155,94, 154,04 (d, J = 248,8 Hz), 153,39, 149,65, 146,70, 144,47, 127,81, 127,68 (d, J = 9,1 Hz), 124,30 (d, J = 4,7 Hz), 123,47, 114,49, 110,58, 110,50 (d, J = 14,3 Hz), 105,99, 82,95 (d, J = 3,5 Hz), 76,70 (d, J = 1,6 Hz), 64,69, 64,50 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₈H₁₃FN₃O₂⁺, 322,0986; hallada, 322,0981.

10 ***N*-[2-fluoro-3-(trifluorometil)fenil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK039).**



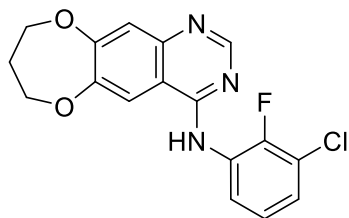
15 Siguiendo el procedimiento general A, se preparó el compuesto JGK039 a partir de 4-cloroquinazolina 1 (37 mg, 0,17 mmol) y 2-fluoro-3-(trifluorometil)anilina (42 μL, 0,33 mmol) en *i*PrOH (1,5 mL). FC (CH₂Cl₂/EtOAc 1:0 → 10:3) proporcionó JGK039 (35 mg, 58%) como un sólido blancuzco. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9,00 – 8,92 (m, 1H), 8,70 (s, 1H), 7,42 (br, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,35 – 7,28 (m, 2H), 7,30 (s, 1H), 4,46 – 4,38 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 155,77, 153,24, 150,27 (d, J = 252,0 Hz), 149,81, 146,80, 144,66, 128,62 (d, J = 8,5 Hz), 126,34, 124,44, 124,40, 122,66 (q, J = 272,4 Hz), 120,41 (q, J = 4,6 Hz), 114,58, 110,55, 105,86, 64,70, 64,51 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M – H][–] calculada para C₁₇H₁₀F₄N₃O₂[–], 364,0715; hallada, 364,0712.

20 **4-cloro-8,9-dihidro-7*H*-[1,4]dioxepino[2,3-*g*]quinazolina (5).**

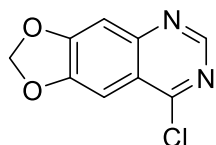


25 Una solución del compuesto 2 (100 mg, 0,51 mmol) en DMF seca (10 mL) se trató con Cs₂CO₃ (460 mg, 1,41 mmol), se agitó durante 15 min y se trató por goteo con 1,3-dibromopropano (135 μL, 1,33 mmol). La mezcla se agitó a 23 °C durante 1 h y entonces se agitó a 65 °C durante 18 h. Después de enfriar hasta 23 °C, todos los volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se suspendió en CH₂Cl₂ (20 mL), se lavó con agua (2 x 5 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por FC (hexanos/CH₂Cl₂ 1:10 → 0:1 → CH₂Cl₂/EtOAc 10:1,5), seguida de una segunda FC (hexanos/EtOAc 10:1 → 10:3) proporcionó el compuesto del título 5 (41 mg, 34%) como un sólido blanco. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,87 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,55 (s, 1H), 4,46 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 4,40 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,34 ppm (quint, J = 5,9 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 160,57, 158,86, 153,10, 153,03, 148,88, 120,83, 118,19, 115,64, 70,51, 70,33, 30,51 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₁H₁₀ClN₂O₂⁺, 237,0425; hallada, 237,0416.

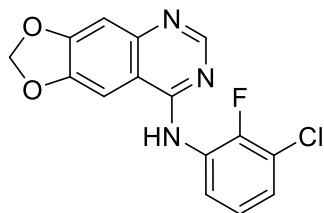
35 ***N*-(3-cloro-2-fluorofenil)-8,9-dihidro-7*H*-[1,4]dioxepino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina**

(JGK040).

Seguendo el procedimiento general A, se preparó el compuesto JGK040 a partir de 4-cloroquinazolina 5 (33 mg, 0,14 mmol) y 3-cloro-2-fluoroanilina (32 μ L, 0,29 mmol) en *i*PrOH (1,5 mL). FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 1:0 $\rightarrow$ 10:3,5) proporcionó JGK040 (34 mg, 70%) como un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,72 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,53 – 7,45 (m, 2H), 7,29 (s, 1H), 7,27 (td, J = 8,1, 1,3 Hz, 1H), 4,32 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 4,29 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,22 ppm (quint, J = 5,6 Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,43, 156,67, 153,85, 152,48 (d, J = 249,3 Hz), 150,74, 147,29, 128,05 (d, J = 12,0 Hz), 127,41, 127,04, 124,91 (d, J = 4,7 Hz), 120,13 (d, J = 16,5 Hz), 117,52, 113,81, 110,77, 70,75, 70,62, 30,80 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$, 346,0753; hallada, 346,0740.

8-cloro-2H-[1,3]dioxolo[4,5-g]quinazolina (6).

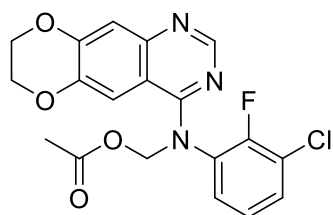
Se trató una solución del compuesto 2 (100 mg, 0,51 mmol) en DMF seca (3,4 mL) con Cs_2CO_3 (335 mg, 1,03 mmol) y se agitó a 23 $^\circ\text{C}$ durante 15 min. La mezcla se trató por goteo con cloroyodometano (130 μ L, 1,79 mmol), se agitó durante 1 h y luego a 70 $^\circ\text{C}$ durante 17 h. Después de que la mezcla se enfriara hasta 23 $^\circ\text{C}$, todos los volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se suspendió en CH_2Cl_2 (30 mL), se lavó con agua (2 x 7 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por FC (hexanos/ CH_2Cl_2 3:10 $\rightarrow$ 0:1 $\rightarrow$ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 10:2) proporcionó el compuesto del título 6 (38 mg, 36%) como un sólido blanco esponjoso. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8,85 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 6,21 ppm (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159,82, 154,89, 152,79, 150,94, 149,78, 121,23, 105,23, 102,89, 101,12 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_9\text{H}_6\text{ClN}_2\text{O}_2^+$, 209,0112; hallada, 209,0104.

N-(3-cloro-2-fluorofenil)-2H-[1,3]dioxolo[4,5-g]quinazolin-8-amina (JGK041).

Seguendo el procedimiento general A, se preparó el compuesto JGK041 a partir de 4-cloroquinazolina 6 (35 mg, 0,17 mmol) y 3-cloro-2-fluoroanilina (38 μ L, 0,35 mmol) en *i*PrOH (1,5 mL). FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 1:0 $\rightarrow$ 1:1) proporcionó JGK041 (35 mg, 66%) como un sólido amarillo pálido. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,53 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,53 – 7,44 (m, 2H), 7,27 (td, J = 8,1, 1,3 Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,25 ppm (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,37, 153,10, 152,60, 152,43 (d, J = 248,9 Hz), 148,56, 147,28, 128,30 (d, J = 11,9 Hz), 127,17, 126,90, 124,88 (d, J = 4,8 Hz), 120,12 (d, J = 16,4 Hz), 109,82, 104,59, 102,38, 98,77 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$, 318,0440; hallada,

318,0435.

Acetato de [(3-cloro-2-fluorofenil)(7,8-dihidro [1,4] dioxino[2,3-g] quinazolin-4-il)amino]metilo (JGK043).



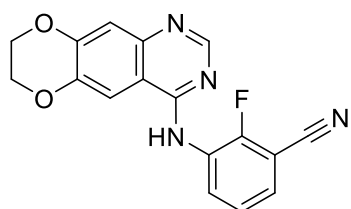
- 5 Se trató por goteo una mezcla de JGK010 (50 mg, 0,15 mmol) en THF seco (0,5 mL) con una solución 1 M de LiHMDS en THF (150 μ L, 0,15 mmol) a 0 °C. Después de agitar durante 15 min a esa temperatura, la mezcla se añadió por goteo a una solución de acetato de clorometilo (55 μ L, 0,57 mmol) en THF seco (0,5 mL). El matraz que inicialmente contenía la solución de JGK010 se lavó con 0,5 mL de THF seco y se añadió a la mezcla de reacción. Después de
- 10 agitar a 0 ° C durante 2 h, se continuó la agitación a 23 °C durante 22 h. Se agregó NaHCO₃ ac. sat. (10 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 10 mL). Los orgánicos combinados se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. La purificación por FC (CH₂Cl₂/EtOAc 1:0 -> 1:1) proporcionó el compuesto del título JGK043 (30 mg, 49%) como un sólido amarillo pálido. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,93 (s, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,08 – 6,97 (m, 2H), 6,94 (td, *J* = 7,2, 2,1 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 5,73 (s, 2H), 4,40 – 4,29 (m, 4H), 2,12 ppm (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 170,33, 152,96, 150,10 (d, *J* = 245,6 Hz), 149,37, 148,05, 143,24, 140,17 (d, *J* = 13,1 Hz), 131,89, 124,17, 124,12 (d, *J* = 4,8 Hz), 122,59 (d, *J* = 2,4 Hz), 121,33 (d, *J* = 17,1 Hz), 115,41, 114,31, 102,24, 71,19, 65,07, 64,23, 20,85 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₉H₁₆ClFN₃O₄⁺, 404,0808; hallada, 404,0792.

20 **Ejemplo 3: Preparación de compuestos ilustrativos adicionales de la serie JGK**

- Procedimientos generales:** Todos los químicos, reactivos y solventes se adquirieron de fuentes comerciales cuando estuvieran disponibles y se utilizaron tal cual se recibieron. Cuando fue necesario, los reactivos y solventes se purificaron y secaron mediante métodos estándar. Las reacciones sensibles al aire y a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera inerte de argón en material de vidrio secado al horno. Las reacciones irradiadas con microondas se
- 25 llevaron a cabo en un sintetizador de microondas CEM Discover de reactor de modo simple. Las reacciones a temperatura ambiente (T.A.) se llevaron a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Todas las reacciones se controlaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ precubiertas, donde las manchas se
- 30 visualizaron mediante luz UV (λ = 254, 365 nm) o mediante el uso de una solución de KMnO₄ alcalina. La cromatografía en columna ultrarrápida (FC) se llevó a cabo en SiO₂ 60 (tamaño de partícula 0,040–0,063 mm, 230–400 mesh). La concentración a presión reducida (al vacío) se realizó mediante evaporación rotatoria a 25–50 °C. Los compuestos purificados se secaron
- 35 purificados y no se optimizaron adicionalmente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (que funcionan a 300, 400 o 500 MHz). Los espectros de NMR de carbono (¹³C RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (ya sea a 400 ó 500 MHz). Los desplazamientos químicos de NMR (δ ppm) se

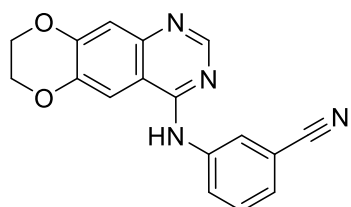
referenciaron a las señales de solvente residual. Los datos de ^1H NMR se informan como sigue: desplazamiento químico en ppm; multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, quint = quinteto, m = multiplete/patrón complejo, td = triplete de dobletes, ddd = doblete de doblete de dobletes, br = señal amplia); constantes de acoplamiento (J) en Hz, integración. Los datos para espectros de ^{13}C NMR se informan en términos de desplazamiento químico y de constantes de acoplamiento aplicables. Los datos de espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrometro de masas Thermo Fisher Scientific Exactive Plus con fuente IonSense ID-CUBE DART o en un espectrometro de masas Waters LCT Premier con ACQUITY UPLC con automuestreador.

10 **3-[(7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-il)amino]-2-fluorobenzonitrilo (JGK044).**



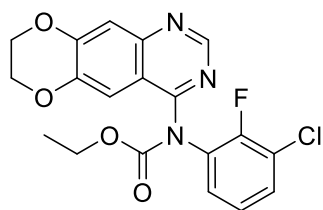
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 9,06 – 8,98 (m, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,39 (br, 1H), 7,35 – 7,31 (m, 2H), 7,30 (s, 1H), 4,45 – 4,37 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 155,63, 153,63 (d, J = 254,6 Hz), 153,04, 149,94, 146,80, 144,76, 128,60 (d, J = 7,8 Hz), 127,48, 126,58, 125,31 (d, J = 4,5 Hz), 114,56, 113,80, 110,45, 105,83, 101,30 (d, J = 13,9 Hz), 64,70, 64,51 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FN}_4\text{O}_2^+$, 323,0939; hallada, 323,0927.

15 **3-[(7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-il)amino]benzonitrilo (JGK045).**



20 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9,68 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,46 (t, J = 1,9 Hz, 1H), 8,18 (ddd, J = 8,2, 2,3, 1,2 Hz, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,58 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,53 (dt, J = 7,6, 1,4 Hz, 1H), 7,22 (s, 1H), 4,49 – 4,36 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 156,24, 152,69, 149,31, 146,15, 143,80, 140,52, 129,87, 126,35, 125,96, 124,15, 118,93, 112,66, 111,23, 109,96, 108,30, 64,52, 64,19 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2^+$, 305,1033; hallada, 305,1018.

25 **(3-cloro-2-fluorofenil)7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-ilcarbamato de etilo (JGK047).**

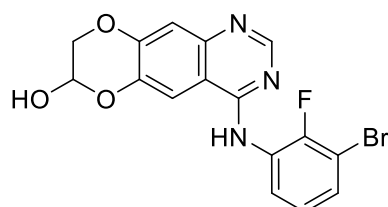


30

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,96 (s, 1H), 7,483 (s, 1H), 7,477 (s, 1H), 7,37 (dd, J = 8,1, 6,7

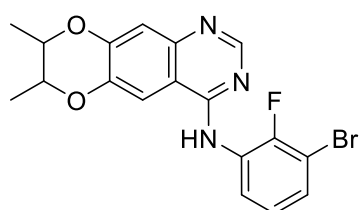
Hz, 2H), 7,08 (td, $J = 8,1, 1,5$ Hz, 1H), 4,45 – 4,38 (m, 4H), 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,22 ppm (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): 158,98, 154,43 (d, $J = 250,7$ Hz), 153,90, 153,41, 151,17, 149,68, 145,61, 130,12, 129,85 (d, $J = 12,4$ Hz), 128,20, 124,50 (d, $J = 5,1$ Hz), 122,22 (d, $J = 16,8$ Hz), 117,96, 113,51, 109,68 (d, $J = 2,0$ Hz), 64,73, 64,36, 63,44, 14,43 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClFN}_3\text{O}_4^+$, 404,0808; hallada, 404,0800.

(±)-4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-7-ol ((±)-JGK050).



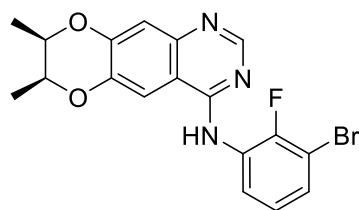
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 9,61$ (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,72 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 7,60 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,55 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,19 (s, 1H), 5,70 – 5,59 (m, 1H), 4,27 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H), 4,17 ppm (d, $J = 10,6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 157,18, 153,38$ (d, $J = 247,4$ Hz), 153,13, 148,78, 146,14, 141,92, 130,12, 128,05 (d, $J = 13,8$ Hz), 127,78, 125,45 (d, $J = 4,4$ Hz), 111,95, 109,87, 108,71, 108,55 (d, $J = 20,3$ Hz), 88,63, 67,23 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrFN}_3\text{O}_3^+$, 392,0041; hallada, 392,0030.

Mezcla diastereomérica de (±)-cis- y (±)-trans-N-(3-bromo-2-fluorofenil)-7,8-dimetil-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-amina ((±)-cis/trans-JGK051).



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 ; (±)-cis/trans 2:1): $\delta = 8,68$ (s, 1H), 8,68 – 8,63 (m, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,35 (br, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,28 – 7,24 (m, 1H), 7,10 (td, $J = 8,2, 1,6$ Hz, 1H), 4,52 – 4,39 (m, 1,3H), 4,09 – 3,98 (m, 0,7H), 1,453 (d, $J = 6,1$ Hz, 1,1H), 1,451 (d, $J = 6,1$ Hz, 1,1H), 1,369 (d, $J = 6,6$ Hz, 1,9H), 1,368 ppm (d, $J = 6,6$ Hz, 1,9H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 ; (±)-cis/trans 2:1): $\delta = 155,87, 155,84, 153,19, 150,12$ (d, $J = 242,5$ Hz), 150,09 (d, $J = 242,2$ Hz), 149,87, 148,89, 146,77, 144,64, 143,63, 128,73 (d, $J = 10,0$ Hz), 127,15, 127,12, 125,31 (d, $J = 4,7$ Hz), 121,71, 121,70, 114,30, 113,93, 110,54, 110,47, 108,57 (d, $J = 19,4$ Hz), 105,66, 105,28 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$, 404,0404; hallada, 404,0393.

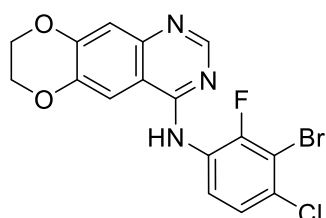
(±)-cis-N-(3-bromo-2-fluorofenil)-7,8-dimetil-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-amina ((±)-JGK052).



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,68$ (s, 1H), 8,66 (ddd, $J = 8,6, 7,4, 1,6$ Hz, 1H), 7,38 (s, 1H),

7,35 (br, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,30 – 7,23 (m, 1H), 7,10 (td, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H), 4,50 – 4,41 (m, 2H), 1,369 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,368 ppm (d, $J = 6,5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 155,85, 153,19, 150,11$ (d, $J = 242,1$ Hz), 148,89, 146,77, 143,63, 128,73 (d, $J = 10,2$ Hz), 127,14, 125,31 (d, $J = 4,7$ Hz), 121,71, 114,30, 110,54, 108,57 (d, $J = 19,5$ Hz), 105,65, 72,85, 72,58, 14,71, 14,55 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$, 404,0404; hallada, 404,0416.

***N*-(3-bromo-4-cloro-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK053).**

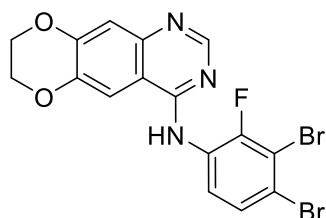


10

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 9,70$ (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,61 (dd, $J = 8,8, 7,7$ Hz, 1H), 7,55 (dd, $J = 8,7, 1,5$ Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 4,47 – 4,35 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 157,03, 154,14$ (d, $J = 249,5$ Hz), 153,01, 149,36, 146,08, 143,74, 130,75, 127,77 (d, $J = 2,9$ Hz), 126,80 (d, $J = 13,4$ Hz), 125,37 (d, $J = 3,8$ Hz), 112,50, 110,15 (d, $J = 22,5$ Hz), 109,66, 108,39, 64,51, 64,14 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrClFN}_3\text{O}_2^+$, 409,9702; hallada, 409,9697.

15

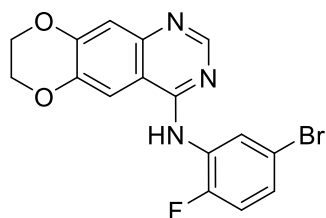
***N*-(3,4-dibromo-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK054).**



^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 9,65$ (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,67 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,55 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 4,45 – 4,35 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 156,95, 153,98$ (d, $J = 249,1$ Hz), 152,99, 149,35, 146,09, 143,74, 128,50 (d, $J = 3,7$ Hz), 128,14, 127,21 (d, $J = 13,7$ Hz), 120,96, 112,51, 112,33, 109,68, 108,36, 64,51, 64,14 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{FN}_3\text{O}_2^+$, 453,9197; hallada, 453,9191.

20

***N*-(5-bromo-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK055).**

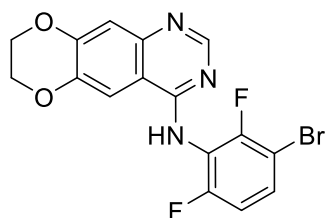


^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,99$ (dd, $J = 7,3, 2,5$ Hz, 1H), 8,72 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,36 (br, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,16 (ddd, $J = 8,7, 4,6, 2,5$ Hz, 1H), 7,04 (dd, $J = 10,9, 8,7$ Hz, 1H), 4,44 – 4,36 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 155,59, 153,35, 152,16$ (d, $J = 243,1$ Hz), 149,69, 146,67, 144,52, 128,75 (d, $J = 10,5$ Hz), 126,16 (d, $J = 7,6$ Hz), 125,06, 117,19 (d, $J =$

30

3,4 Hz), 116,20 (d, $J = 20,9$ Hz), 114,52, 110,48, 105,85, 64,68, 64,50 ppm. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{16}H_{12}BrFN_3O_2^+$, 376,0091; hallada, 376,0077.

***N*-(3-bromo-2,6-difluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK056).**

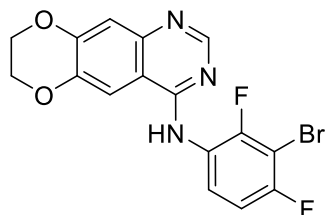


5

^1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 9,60$ (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,74 (td, $J = 8,1, 5,5$ Hz, 1H), 7,28 (t, $J = 9,3$ Hz, 1H), 7,21 (s, 1H), 4,44 – 4,38 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 157,78$ (dd, $J = 248,8, 3,3$ Hz), 157,37, 155,01 (dd, $J = 247,9, 4,9$ Hz), 153,08, 149,47, 146,04, 143,86, 130,76 (d, $J = 9,3$ Hz), 117,30 (t, $J = 17,5$ Hz), 113,30 (dd, $J = 21,8, 3,0$ Hz), 112,56, 109,45, 108,28, 103,55 (dd, $J = 20,4, 3,6$ Hz), 64,52, 64,14 ppm. HRMS (ESI): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; hallada, 394,0008.

10

***N*-(3-bromo-2,4-difluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK057).**

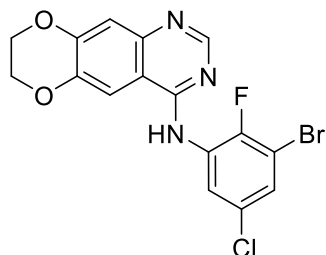


15

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8,64$ (s, 1H), 8,51 (td, $J = 9,0, 5,6$ Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,23 (br, 1H), 7,04 (ddd, $J = 9,2, 7,8, 2,1$ Hz, 1H), 4,45 – 4,37 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 156,10, 155,80$ (dd, $J = 246,6, 3,5$ Hz), 153,28, 151,25 (dd, $J = 245,1, 4,0$ Hz), 149,74, 146,56, 144,53, 124,39 (dd, $J = 10,8, 3,4$ Hz), 122,72 (dd, $J = 8,3, 1,8$ Hz), 114,42, 111,49 (dd, $J = 22,5, 3,9$ Hz), 110,34, 105,98, 97,86 (dd, $J = 25,7, 22,9$ Hz), 64,69, 64,50 ppm. HRMS (ESI): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{16}H_{11}BrF_2N_3O_2^+$, 393,9997; hallada, 394,0013.

20

***N*-(3-bromo-5-cloro-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK058).**

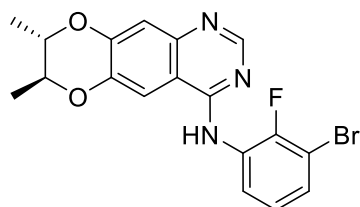


25

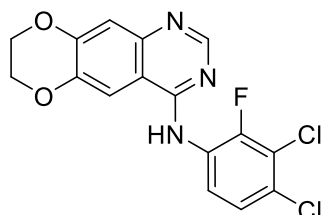
^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8,88$ (dd, $J = 6,6, 2,6$ Hz, 1H), 8,73 (s, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,37 (br, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,28 – 7,23 (m, 1H), 4,44 – 4,39 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 155,45, 153,13, 149,88, 148,60$ (d, $J = 241,7$ Hz), 146,76, 144,72, 130,30 (d, $J = 4,4$ Hz), 129,26 (d, $J = 10,8$ Hz), 126,08, 121,21, 114,60, 110,49, 108,68 (d, $J = 20,9$ Hz), 105,71, 64,70, 64,52 ppm. HRMS (ESI): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{16}H_{11}BrClFN_3O_2^+$, 409,9702; hallada, 409,9713.

30

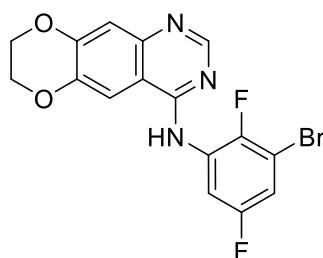
***(\pm)*-trans-N-(3-bromo-2-fluorofenil)-7,8-dimetil-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-**

amina ((±)-JGK059).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,68 (s, 1H), 8,66 (ddd, J = 8,6, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,376 (s, 1H),
 5 7,375 (br, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,28 – 7,24 (m, 1H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,08 – 3,98 (m,
 2H), 1,451 (d, J = 6,1 Hz, 3H), 1,448 ppm (d, J = 6,1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ =
 155,90, 153,12, 150,12 (d, J = 242,5 Hz), 149,90, 146,59, 144,65, 128,70 (d, J = 10,2 Hz),
 127,18, 125,30 (d, J = 4,5 Hz), 121,74, 113,84, 110,43, 108,57 (d, J = 19,2 Hz), 105,31, 75,31,
 75,05, 17,23, 17,20 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$, 404,0404;
 10 hallada, 404,0405.

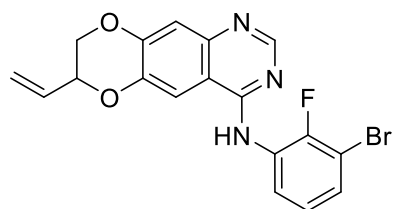
***N*-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK060).**

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,67 (s, 1H), 8,59 (t, J = 8,6 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,38 (br, 1H),
 15 7,33 (dd, J = 9,1, 2,1 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 4,45 – 4,38 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3):
 δ = 155,84, 153,08, 149,98 (d, J = 246,3 Hz), 149,88, 146,42, 144,67, 127,55, 127,19 (d, J =
 10,0 Hz), 125,30 (d, J = 4,1 Hz), 121,05, 120,47 (d, J = 18,2 Hz), 114,36, 110,43, 105,97, 64,71,
 64,51 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_3\text{O}_2^+$, 366,0207; hallada,
 366,0207.

***N*-(3-bromo-2,5-difluorofenil)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (JGK061).**

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9,65 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,63 – 7,54 (m, 2H),
 7,21 (s, 1H), 4,45 – 4,37 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 157,29 (d, J = 243,5
 25 Hz), 156,84, 152,93, 149,97 (d, J = 242,9 Hz), 149,43, 146,16, 143,81, 129,22 – 128,44 (m),
 116,30 (d, J = 26,7 Hz), 113,99 (d, J = 25,7 Hz), 112,53, 109,73, 108,76 (dd, J = 22,5, 12,5 Hz),
 108,33, 64,52, 64,15 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{BrF}_2\text{N}_3\text{O}_2^+$,
 393,9997; hallada, 393,9988.

((±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-etenil-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina ((±)-JGK062).



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,68 (s, 1H), 8,65 (ddd, J = 8,2, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,37 (br, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,27 (ddd, J = 8,0, 6,4, 1,5 Hz, 1H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 5,95 (ddd, J = 17,3, 10,7, 5,8 Hz, 1H), 5,60 (dt, J = 17,3, 1,2 Hz, 1H), 5,48 (dt, J = 10,7, 1,1 Hz, 1H), 4,82 – 4,74 (m, 1H), 4,42 (dd, J = 11,5, 2,5 Hz, 1H), 4,09 ppm (dd, J = 11,6, 8,1 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 155,90, 153,38, 150,14 (d, J = 242,4 Hz), 149,12, 146,70, 144,12, 131,48, 128,64 (d, J = 10,3 Hz), 127,24, 125,30 (d, J = 4,7 Hz), 121,76, 120,43, 114,29, 110,69, 108,58 (d, J = 19,3 Hz), 106,06, 74,03, 67,84 ppm. HRMS (DART): m/z [M + H]⁺ calculada para C₁₈H₁₄BrFN₃O₂⁺, 402,0248; hallada, 402,0233.

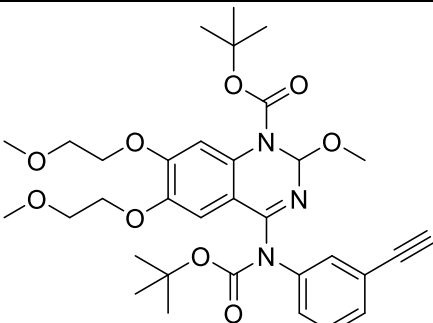
Ejemplo 4: Protocolo de ensayo y bioactividad de compuestos ilustrativos

El ensayo de cinasa de EGFR libre de células se realizó mediante el uso de el sistema de cinasa de EGFR (Promega n.º V3831). Se utilizaron 13 concentraciones a diluciones dobles de 250 nM a 0,03052 nM, un control sin fármaco y un control sin enzima por duplicado en 25 ng de enzima EGFR por reacción. Se usó el ensayo de cinasa ADP-Glo (Promega n.º V6930) para medir la actividad de EGFR en presencia de inhibidores.

Los ensayos GI₅₀ se realizaron mediante el uso de células de glioblastoma derivadas de pacientes. Se colocaron 13 concentraciones a diluciones dobles de 40 000 nM a 9,77 nM (para líneas de GBM) o de 4000 nM a 0,977 nM (para líneas de cáncer de pulmón (HK031)) en placas de 384 pocillos por cuádruplicado con 1500 células por pocillo. Las células se incubaron durante 3 días y luego se evaluó la proliferación mediante Cell Titer Glo (Promega n.º G7570). Como referencia, Erlotinib presentó una GI₅₀ de 642 nM (HK301) y 2788 nM (GBM39).

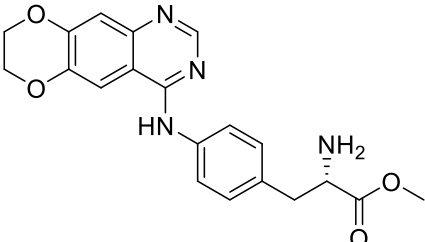
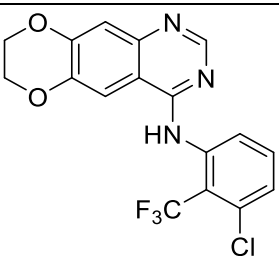
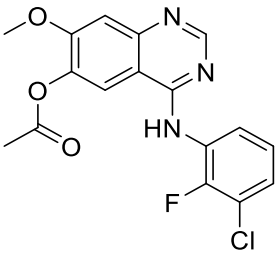
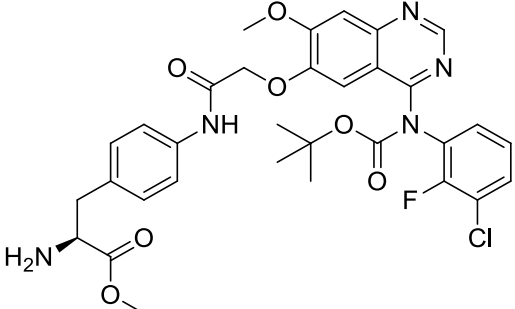
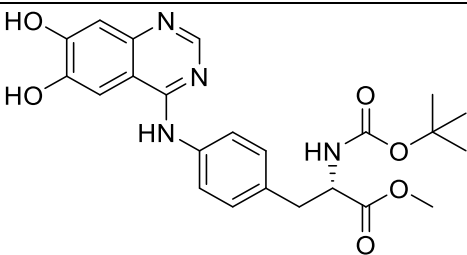
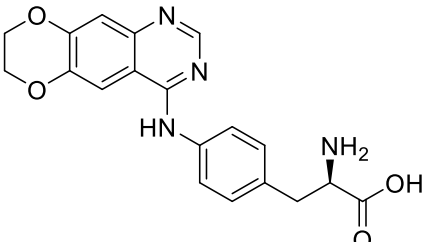
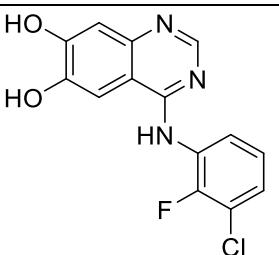
Se realizaron estudios farmacocinéticos en ratones CD-1 machos de 8 a 10 semanas de edad. A los ratones se les administraron dosis como se indica por duplicado. En esos momentos, se obtuvo sangre entera mediante sangrado retroorbital y se extrajo tejido cerebral. Las muestras sanguíneas se centrifugaron para obtener plasma y el tejido cerebral se lavó y homogeneizó. Las muestras se extrajeron con acetonitrilo y el sobrenadante se secó mediante el uso de speed-vac. Las muestras secas se solubilizaron en acetonitrilo:agua:ácido fórmico 50:50:0,1 y se cuantificaron en un sistema LC/MS de triple cuádrupolo Agilent serie 6400.

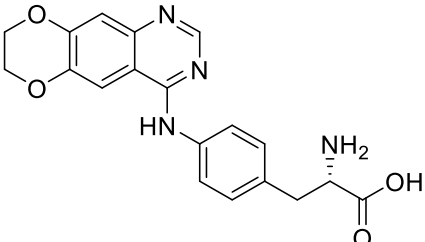
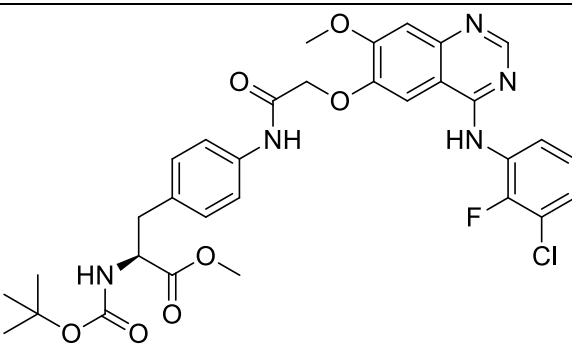
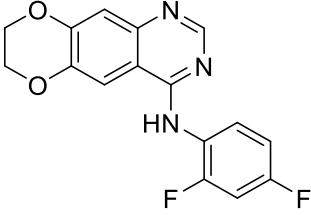
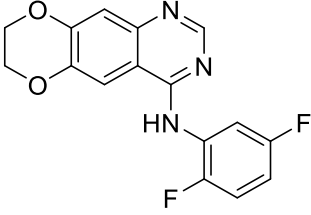
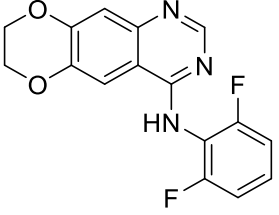
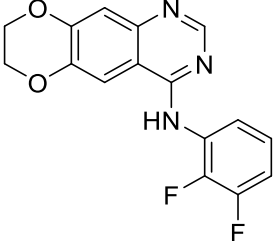
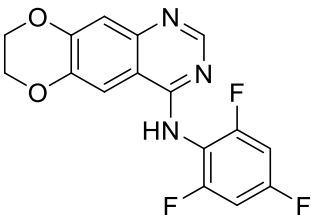
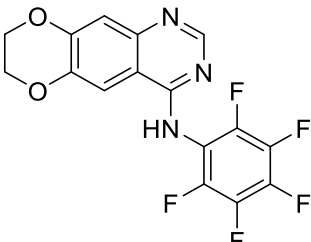
Tabla 3: actividad de compuestos ilustrativos

Número	Estructura	HK301 (nM)	GI ₅₀	GBM39 (nM)	GI ₅₀
JGK001		2214		19670	

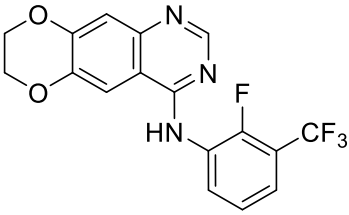
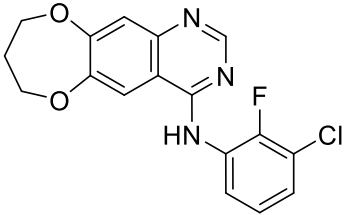
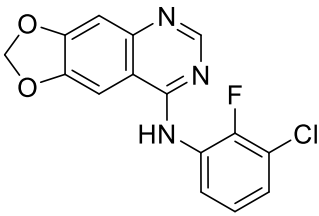
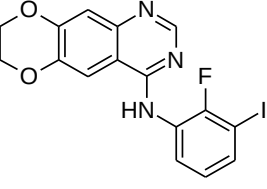
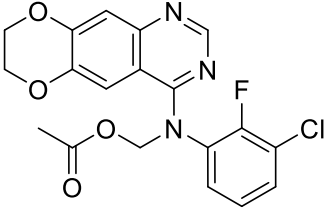
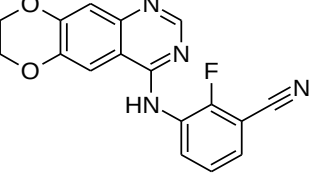
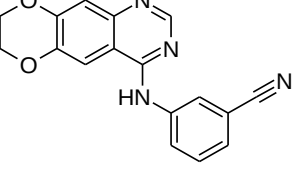
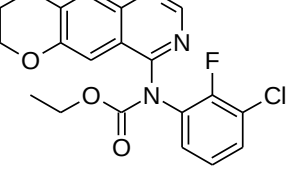
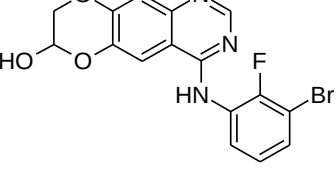
Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ (nM)	GBM39 (nM)	Gl ₅₀
JGK002		5448		19820	
JGK003		1127		23110	
JGK004		23383		102690	
JGK005		8824		20536	
JGK006		11012		51380	
JGK007		92147		-	
JGK008		81269		-	

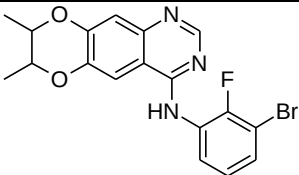
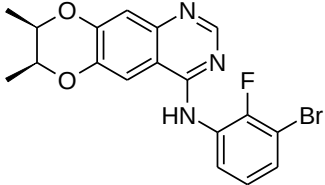
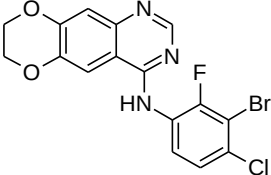
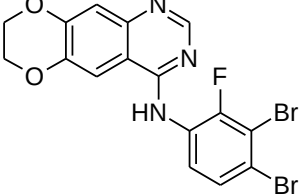
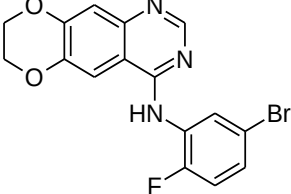
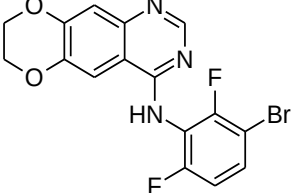
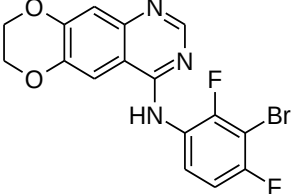
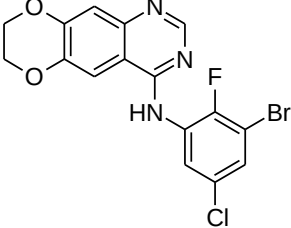
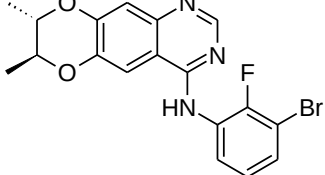
Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ (nM)	GBM39 (nM)	Gl ₅₀
JGK009		6096		14640	
JGK010		780,5		2594	
JGK011		9206		3252	
JGK0012		5477		10820	
JGK013		1551		219870	
JGK014		11816		27914	
JGK015		2154		11540	

Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ GBM39 (nM)
JGK016		4052	61593
JGK017		64235	97624
JGK018		1071	4543
JGK019		-	-
JGK020		29236	36179
JGK021		480850	555780
JGK022		31116	150164

Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ GBM39 (nM)
JGK023		86230	96260
JGK024		156370	124940
JGK025		10659	27706
JGK026		6124	16525
JGK027		5807	11837
JGK028		1688	5572
JGK029		24395	33970
JGK030		558742	961204

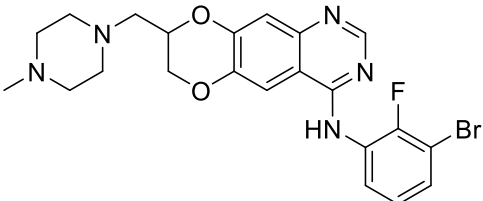
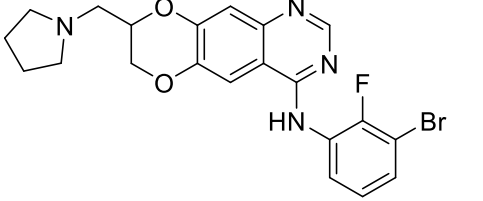
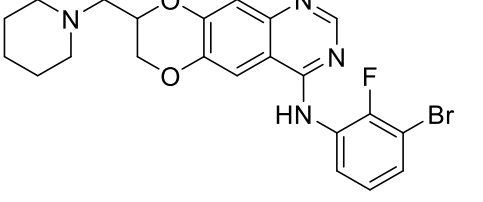
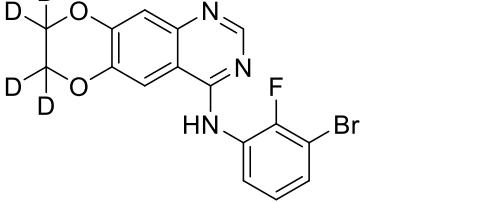
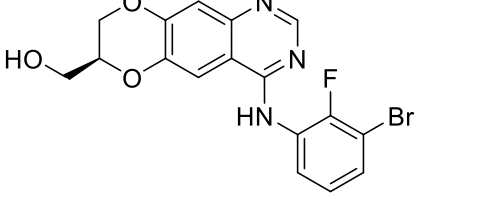
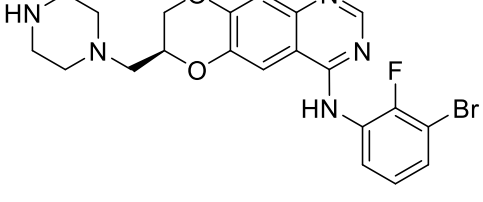
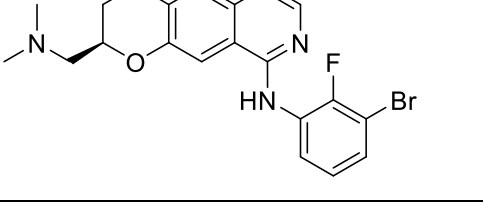
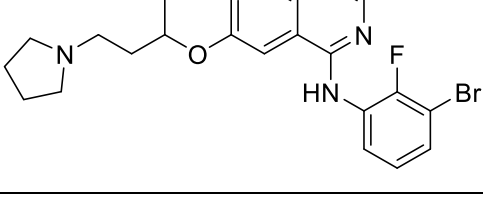
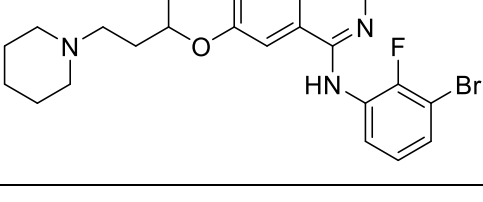
Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ GBM39 (nM)
JGK031		-	-
JGK032		780,5	2594
JGK033		-	-
JGK035		4040	10721
JGK036		1046	4507
JGK037		329,3	1116
JGK038		791,1	2946

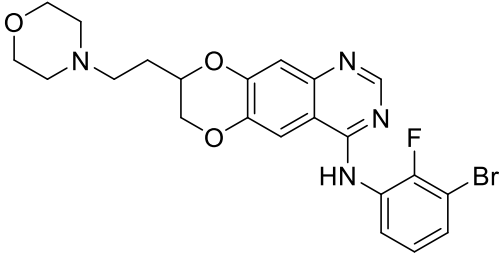
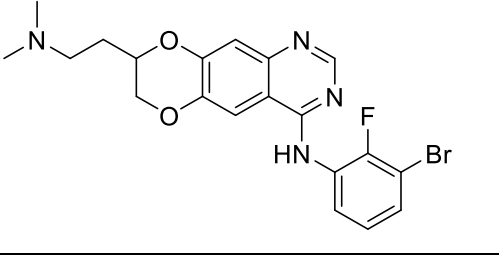
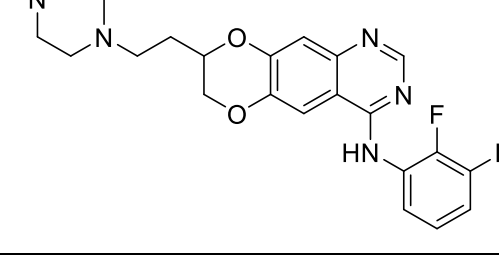
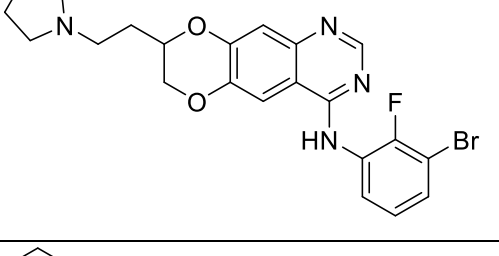
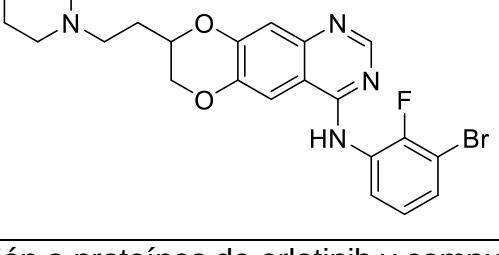
Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀	GBM39 (nM)	Gl ₅₀
JGK039		3614		7820	
JGK040		1721		7115	
JGK041		1658		6042	
JGK042		2294		4521	
JGK043		745		1778	
JGK044		4522		5635	
JGK045		3940		10939	
JGK047		316000		-	
JGK050		1159		3568	

Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ GBM39 (nM)
JGK051		8253	24140
JGK052		3866	9219
JGK053		2778	5277
JGK054		5723	7697
JGK055		290,1	966,4
JGK056		418,7	1355,8
JGK057		1382,7	9361,5
JGK058		1852,7	12974
JGK059		8110	11218

Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀	GBM39 (nM)	Gl ₅₀
JGK060		2947		3501	
JGK061		1131		1727	
JGK062		3784		5856	
JGK063		816		3431	
JGK064		1213		4005	
JGK065		3432		7339	
JGK066		734		2395	
JGK067		898		2198	
JGK068		577		1613	
JGK068S		439,7		1212	

Número	Estructura	HK301 (nM)	Gl ₅₀ (nM)	GBM39 (nM)	Gl ₅₀
JGK068R		1396		3384	
JGK069		659		2165	
JGK070		1405		3333	
JGK071		5749		10256	
JGK072		5017		12033	
JGK073		2055		6073	
JGK074		2276		6670	
JGK075		1181		4005	
JGK076		6161		16944	
JGK077		6844		16733	

Número	Estructura	HK301 (nM)	GI ₅₀ GBM39 (nM)
JGK078		2034	5758
JGK079		7214	15709
JGK080		7374	14528
JGK081		-	-
JGK082S		1668	1892
JGK083S		529	841
JGK066S		301	2633
JGK084		1835	5638
JGK085		1015	2617

Número	Estructura	HK301 (nM)	GI ₅₀ GBM39 (nM)
JGK086		2559	4453
JGK087		3741	5257
JGK088		2132	4061
JGK089		3162	5090
JGK090		2394	4330

Ejemplo 5: Unión a proteínas de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción

A continuación en la Tabla 4 se ilustra la unión a proteína de erlotinib y varios compuestos ilustrativos de la descripción. Fu se refiere a la “fracción no consolidada”. Kpuu se refiere al “coeficiente de partición sin unir en cerebro y plasma, en equilibrio”.

5 Tabla 4: Unión a proteínas de erlotinib y compuestos ilustrativos de la descripción

Compuesto	Fu (sangre)/Fu (cerebro)	Unido (sangre)/(cerebro)	Kpuu (promedio)
Erlotinib	4,88%	95,12%	0,0513
	2,93%	97,07%	
AZD3759	5,20%	94,80%	0,802
	1,44%	98,56%	
JGK005	1,35%	98,65%	0,491
	1,02%	98,98%	
JGK038	1,30%	98,70%	0,575

	0,89%	99,11%	
JGK028	1,44%	98,56%	1,037
	1,41%	98,59%	
JGK010	1,12%	98,88%	1,045
	1,10%	98,90%	
JGK037	1,70%	98,30%	1,301
	1,04%	98,96%	
JGK042	1,85%	98,15%	1,033
	1,14%	98,86%	
JGK063	8,04%	91,96%	0,341
	3,78%	96,22%	
JGK066	7,04%	92,96%	1,175
	3,02%	96,98%	
JGK068	6,31%	93,69%	1,184
	2,11%	97,89%	
JGK068S	5,96%	94,04%	1,181
	1,86%	98,14%	
JGK068R	5,33%	94,67%	1,046
	1,57%	98,43%	
JGK083S	7,02%	92,98%	0,798
	2,42%	97,58%	

Ejemplo 6: Clasificación de respondedores metabólicos y no respondedores a EGFRi

Se caracterizaron los cambios en el consumo de glucosa con inhibición aguda de EGFR en 19 líneas celulares de GBM derivadas de pacientes. Las células se cultivaron en medio libre de suero complementado como gliomasferas que, a diferencia de las condiciones de cultivo basadas en suero, conservan muchas de las características moleculares de los tumores de los pacientes. El tratamiento con el inhibidor de tirosina cinasa EGFR (EGFRi) erlotinib identificó un subconjunto de GBM cuya absorción de glucosa radiomarcada (¹⁸F-FDG) se atenuó significativamente con la inhibición de EGFR; en lo sucesivo denominados “respondedores metabólicos” (FIG. 21A y FIG. 27A). El silenciamiento de *EGFR* mediante el uso de ARNip confirmó que la reducción en la absorción de glucosa no se debió a efectos fuera del objetivo de erlotinib (FIG. 27B, 27C). La absorción reducida de ¹⁸F-FDG en las células tratadas con EGFRi se asoció con una disminución de la producción de lactato, el consumo de glucosa y la tasa de acidificación extracelular (ECAR), aunque los niveles de glutamina permanecieron sin cambios (FIG. 21B y FIG. 27D-G). Finalmente, la disminución de la utilización de glucosa se correlacionó con perturbaciones en la señalización de RAS-MAPK y PI3K-AKT-mTOR, cada una de las cuales puede regular el metabolismo de la glucosa en GBM y otros cánceres (FIG. 28A).

Por el contrario, en todos los GBM “no respondedores” (es decir, sin cambios en la absorción de ¹⁸F-FDG con EGFRi o ARNip) (FIG. 21A y FIG. 27B, 27C), no se observaron cambios en el consumo de glucosa, producción de lactato y ECAR a pesar de la fuerte inhibición de EGFR

(FIG. 21B, FIG. 27D-G y FIG. 28B). Además, la señalización de RAS-MAPK y PI3K-AKT-mTOR no se vio afectada en gran medida en estas células (FIG. 28B). Notablemente, mientras que todos los respondedores metabólicos tenían alteraciones en *EGFR* (ganancia de número de copias, mutación), 6 líneas de GBM sin una respuesta metabólica también contenían mutaciones de *EGFR* y/o ganancias en el número de copias (FIG. 29A, 29B). En conjunto, estos datos ilustran dos puntos clave. En primer lugar, la inhibición aguda de EGFR atenúa rápidamente la utilización de glucosa en un subconjunto de células de GBM primarias y, en segundo lugar, las alteraciones genéticas en *EGFR* no pudieron por sí solas predecir qué GBM tienen una respuesta metabólica a EGFRi.

10 Ejemplo 7: Los respondedores metabólicos de EGFRi están cebados para la apoptosis

Las perturbaciones en el metabolismo de la glucosa pueden inducir la expresión de factores proapoptóticos y estimular la apoptosis intrínseca, lo que sugiere que la absorción reducida de glucosa en respuesta a EGFRi estimularía la vía apoptótica intrínseca. De hecho, el tratamiento agudo con erlotinib promovió la expresión de las proteínas proapoptóticas solo BH3, BIM y PUMA, solo en los cultivos de respuesta metabólica (FIG. 30A). Sin embargo, la tinción con anexina V reveló que los respondedores metabólicos solamente tenían una apoptosis modesta (~17%), si bien significativamente mayor, en comparación con los no respondedores (~3%), después de 72 horas de exposición a erlotinib (FIG. 21C).

El bajo nivel de apoptosis, a pesar de la inducción pronunciada de factores proapoptóticos, llevó a los inventores a preguntarse si la alteración de la absorción de glucosa con EGFRi “ceba” las células de GBM para la apoptosis; mediante lo cual aumenta la propensión para la apoptosis sin inducir una muerte celular significativa. Para probar esto, los inventores trataron tanto a los respondedores metabólicos como a los no respondedores con erlotinib durante 24 horas y realizaron un perfilado dinámico de BH3 para cuantificar los cambios en el cebado apoptótico (FIG. 30B). Mediante el uso de múltiples péptidos BH3 (por ejemplo, BIM, BID y PUMA), se observó un aumento significativo en el cebado apoptótico, según lo determinado por el cambio en la liberación de citocromo c en relación con el vehículo, en los respondedores metabólicos con tratamiento con erlotinib (FIG. 21D, barras de color gris oscuro). Es importante destacar que el cebado en los respondedores metabólicos fue significativamente mayor que el cebado en los no respondedores (FIG. 21D, barras de color gris claro), lo cual sustenta la premisa de que la absorción de glucosa atenuada con EGFRi desencadena el cebado apoptótico en GBM. Los inventores evaluaron si se requiere una absorción reducida de glucosa para el cebado apoptótico con EGFRi, mediante la verificación de si rescatar el consumo de glucosa mitigaría estos efectos. Para probar esto, los transportadores de glucosa 1 (GLUT1) y 3 (GLUT3) se expresaron ectópicamente en dos respondedores metabólicos (HK301 y GBM39). La expresión forzada de GLUT1 y GLUT3 (GLUT1/3) rescató la atenuación mediada por EGFRi de la absorción de glucosa y la producción de lactato en ambas líneas celulares (FIG. 21E y FIG. 31A-C) y, lo que es más importante, inhibió marcadamente el cebado apoptótico en respuesta a EGFRi (FIG. 21F). En conjunto, estos datos demuestran que la inhibición del consumo de glucosa mediada por EGFRi, aunque es insuficiente para inducir una muerte celular significativa, reduce el umbral apoptótico, lo que hace que las células de GBM sean potencialmente vulnerables a los agentes que explotan este estado cebado.

Ejemplo 8: Se requiere p53 citoplasmática para el cebado apoptótico con EGFRi

Se investigó el mecanismo por el cual los GBM se preparan para la apoptosis con EGFRi. La inhibición del metabolismo de la glucosa impulsado por oncogenes hace que las células de GBM sean sinérgicamente susceptibles a la apoptosis dependiente de p53 citoplasmática. El flujo metabólico de glucosa atenuado en GBM, a través de la señalización oncogénica dirigida (por ejemplo, EGFRi), da como resultado que p53 citoplasmática se involucre en la vía apoptótica intrínseca ("cebado"). Sin embargo, Bcl-xL bloquea la muerte celular mediada por p53 citoplasmática. La estabilización farmacológica de p53 supera este bloqueo apoptótico, lo que da lugar a una letalidad sinérgica con un direccionamiento combinado del metabolismo de la glucosa impulsado por oncogenes en GBM.

En las células que están en un estado cebado, las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) están cargadas en gran medida con proteínas BH3 proapoptóticas (por ejemplo, BIM, BID, PUMA, MALO, NOXA, HRK); por consiguiente, las células dependen de estas interacciones para sobrevivir. Se sabe que la proteína supresora de tumores, p53, regula por incremento las proteínas proapoptóticas que posteriormente deben unirse a las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas para prevenir la muerte celular. Para examinar si se requiere p53 para el cebado inducido por EGFRi, se silenció p53 con CRISPR/CAS-9 (en lo sucesivo denominada p53KO) en dos respondedores metabólicos (HK301 y HK336, FIG. 22A). Si bien el cambio en el consumo de glucosa con EGFRi no se vio afectado en las células p53KO (FIG. 32A), el perfil de BH3 reveló que p53KO casi abolió el cebado apoptótico inducido por erlotinib en células HK301 y HK336 (FIG. 22B).

Dado que se ha demostrado que la actividad transcripcional de p53 mejora bajo la limitación de glucosa, se investigó para determinar si la transcripción mediada por p53 fue inducida por EGFRi. Sin embargo, erlotinib no aumentó la expresión de genes regulados por p53 (por ejemplo, *p21*, *MDM2*, *PIG3*, *TIGAR*) (FIG. 32B), ni indujo la actividad indicadora de p53-luciferasa en células respondedoras metabólicas HK301 (FIG. 32C). Estos datos indican que, si bien se requiere p53 para cebar con EGFRi, su actividad transcripcional puede no ser necesaria.

Además de las funciones nucleares bien descritas de p53, p53 puede localizarse en el citoplasma donde puede participar directamente en la vía apoptótica intrínseca. Para evaluar si p53 citoplasmática es importante para el cebado apoptótico con EGFRi, se indujo de manera estable un mutante de p53 con una señal de localización nuclear defectuosa (p53^{cito}) en las gliomaesferas de p53KO HK301 y HK336. Como se esperaba, p53^{cito} se expresó (FIG. 22C y FIG. 32D), limitada al citoplasma (FIG. 22D y FIG. 32E) y no tuvo actividad transcripcional (FIG. 22E y FIG. 32F). Por el contrario, la reconstitución de p53 de tipo salvaje (p53^{wt}) en células p53KO HK301 y HK336 mostró una localización similar a la de las células originales y rescató la transcripción de genes regulados por p53 (FIG. 22C-E y FIG. 32E-G). Sorprendentemente, la introducción estable de p53^{cito} restauró significativamente el cebado con erlotinib en células p53KO tanto HK301 como HK336 a niveles comparables con p53^{wt} (FIG. 22F y FIG. 32G), lo que indica que la función citoplasmática de p53 es necesaria para el cebado mediado por EGFRi. Para respaldar esto, la introducción de un mutante de p53 transcripcionalmente activo (FIG. 2622G), pero limitado nuclear (p53^{NES}) en células p53KO HK301 no logró inducir el cebado

apoptótico mediado por EGFRi (FIG. 22G, 22H y FIG. 32H). Finalmente, la inhibición farmacológica de la actividad de p53 citoplasmática con pifitrina- μ (PFT μ) redujo marcadamente el cebado con erlotinib (FIG. 32I). En conjunto, estos resultados muestran que p53 citoplasmática se acopla a la maquinaria apoptótica intrínseca después de EGFRi en GBM.

- 5 Trabajos anteriores demostraron que los mutantes de p53 derivados de tumores humanos, específicamente aquellos en el dominio de unión al ADN, tienen funciones citoplasmáticas disminuidas además de deficiencias de transactivación. Por tanto, los inventores probaron si la expresión estable de dos de estos mutantes de p53 de “punto crítico”, R175H o R273H, en p53KO HK301 reduciría el cebado mediado por EGFRi (FIG. 32H). Como se esperaba, ambos
- 10 mutantes carecían de capacidades transcripcionales (FIG. 22G) y, de acuerdo con la actividad citoplasmática reducida, fueron incapaces del cebado apoptótico con EGFRi (FIG. 22H). Por lo tanto, de acuerdo con hallazgos previos, las mutaciones oncogénicas en el dominio de unión al ADN de p53 dan como resultado “aciertos duales”, por lo que se anulan las funciones de transactivación y citoplasmática, lo cual tiene implicaciones para el cebado apoptótico con
- 15 EGFRi.

Ejemplo 9: La inhibición de la absorción de glucosa impulsada por EGFR crea una dependencia explotable de Bcl-xL

- Bcl-xL puede secuestrar p53 citoplasmática y prevenir la apoptosis mediada por p53; mediante lo cual se crea un estado apoptótico preparado y una dependencia de Bcl-xL para la supervivencia. De hecho, el perfil de BH3 reveló una dependencia de Bcl-xL para la supervivencia celular en respondedores metabólicos de EGFRi (FIG. 33A). Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que el consumo de glucosa atenuado con EGFRi puede dar como resultado el secuestro de p53 citoplasmática mediante Bcl-xL. Para investigar esto, se realizaron coimmunoprecipitaciones para examinar la dinámica de las interacciones p53-Bcl-xL
- 20 en respuesta a EGFRi tanto en respondedores ($n=2$) como en no respondedores ($n=2$). Es importante destacar que se observaron interacciones de Bcl-xL y p53 marcadamente intensificadas después del tratamiento con erlotinib en respondedores metabólicos (FIG. 23A) pero no en no respondedores (FIG. 23B). Esto sugiere que la inhibición del consumo de glucosa dependiente de EGFR da como resultado el secuestro de p53 por Bcl-xL. De acuerdo con esta
- 30 interpretación, la expresión ectópica de GLUT1/3, que rescata la reducción mediada por EGFRi en la absorción de glucosa y el cebado apoptótico, evitó la asociación de p53 con Bcl-xL (FIG. 23C y FIG. 33B). Estos hallazgos indican claramente que la inhibición de la absorción de glucosa mediada por EGFRi ceba a las células de GBM para la apoptosis al promover una interacción entre p53 citoplasmática y Bcl-xL.

- 35 La liberación de p53 de Bcl-xL permite que p53 active directamente BAX, lo que da como resultado la liberación del citocromo c y la muerte celular. Una vez que se reconoció el aumento de la unión entre Bcl-xL y p53 en los respondedores metabólicos en respuesta a EGFRi, se cuestionó si el desplazamiento de p53 de Bcl-xL provoca la apoptosis. Para probar esto, se trató un respondedor metabólico (HK301) con erlotinib y el inhibidor específico de Bcl-xL, WEHI-539.
- 40 La adición de WEHI-539 interrumpió la asociación de Bcl-xL con p53 bajo tratamiento con erlotinib (FIG. 23D), lo que condujo a una letalidad sinérgica en las células HK301 y GBM39 (respondedores metabólicos) (FIG. 23E). Notablemente, p53 citoplasmática fue suficiente para

los efectos combinatorios en células respondedoras metabólicas a EGFRi (FIG. 33C). Sin embargo, WEHI-539 no mejoró la apoptosis en un no respondedor (HK393) tratado con erlotinib, lo que sugiere que la atenuación de la absorción de glucosa con EGFRi, y la asociación posterior entre p53 y Bcl-xL, es necesaria para generar una dependencia de Bcl-xL para la supervivencia (FIG. 33E). Como respaldo de esto, la expresión forzada de GLUT1/3 mitigó significativamente la muerte celular con la combinación de fármacos (FIG. 23F y FIG. 33D). Juntas, estas observaciones indican que Bcl-xL atenúa la muerte celular de GBM en respuesta a la inhibición de la absorción de glucosa mediada por EGFRi al secuestrar p53 citoplasmática (FIG. 32G).

Ejemplo 10: El direccionamiento combinado de EGFR y p53 es sinérgico en los respondedores metabólicos de EGFRi

Los estudios mecanicistas revelaron una oportunidad terapéutica potencial en GBM impulsados por EGFR que dependerán de p53 funcional. Si bien el eje de señalización de p53 es una de las tres vías centrales alteradas en GBM, el análisis del conjunto de datos de GBM TCGA demostró que las mutaciones de *p53* son mutuamente excluyentes con alteraciones en *EGFR* (FIG. 28A y 28B). Por el contrario, en pacientes con mutaciones o ganancias de *EGFR*, la vía de p53 puede suprimirse mediante la amplificación de *MDM2* y/o deleciones en el regulador negativo de MDM2, p14 ARF, en el locus de *CDKN2A*. Dadas estas relaciones, y el requisito de p53 para cebar bajo la absorción de glucosa atenuada por EGFRi, se planteó la hipótesis de que la estabilización de p53 mediante la inhibición de MDM2 puede tener efectos terapéuticos similares al antagonismo de Bcl-xL. Mediante el uso de nutlina, un inhibidor ampliamente caracterizado de MDM2, se halló una letalidad sinérgica sorprendente cuando se combina con erlotinib en una gliomaesfera de respuesta metabólica. Más del 90% de las células HK301 sufrieron apoptosis con erlotinib y nutlina combinados (FIG. 24C). Cabe destacar que no se observó sinergia entre estos fármacos en un no respondedor metabólico (GS017, FIG. 24C). Luego los inventores probaron esta combinación en su panel de células de GBM primario (todas p53 de tipo salvaje) y hallaron letalidad sinérgica solo en GBM respondedor metabólico a EGFRi (FIG. 24D y FIG. 34A). La atenuación genética de *EGFR* confirmó la sinergia solo en los respondedores metabólicos (FIG. 34B). Es importante destacar que la expresión forzada de GLUT1/3 redujo significativamente la oligermización de BAX, la liberación de citocromo c y la apoptosis con erlotinib y nutlina combinados (FIG. 24E y FIG. 34C), lo cual respalda el concepto de que la inhibición del metabolismo de la glucosa con EGFRi es necesaria para los efectos sinérgicos de la combinación de erlotinib y nutlina.

A continuación, se investigó el papel de p53 en provocar la muerte celular a erlotinib y nutlina combinados. Como se esperaba, el direccionamiento de CRISPR/CAS-9 de p53 en dos respondedores metabólicos de EGFRi (HK301 y HK336) mitigó completamente la sensibilidad a la combinación de fármacos (FIG. 24F). Asimismo, la expresión ectópica de Bcl-xL suprimió marcadamente la muerte celular con el tratamiento combinado, congruente con una función crucial de Bcl-xL en el antagonismo de la apoptosis mediada por p53 (FIG. 34D). Además, de forma similar a los resultados con la inhibición de Bcl-xL (por ejemplo, WEHI-539), la adición de p53 liberada por nutlina de Bcl-xL bajo tratamiento con erlotinib (FIG. 24G). Estos datos están de acuerdo con observaciones previas de que la estabilización de p53 puede estimular la apoptosis mediada por p53 citoplasmática. En respaldo a la sugerencia de que la actividad de

p53 citoplasmática es necesaria para EGFRi y la apoptosis inducida por nutlina en respondedores metabólicos, el bloqueo de la actividad de p53 citoplasmática con PFTμ redujo significativamente los efectos sinérgicos de la combinación (FIG. 34E), mientras que las células HK301 que contienen p53 mutante limitada nuclear, p53^{NES}, fueron incapaces de potenciar la apoptosis con erlotinib y nutlina (FIG. 34F). Finalmente, los mutantes de “punto crítico” del cáncer, R175H y R273H, que tienen tanto transactivación como deficiencias citoplasmáticas, fueron completamente insensibles a la combinación de fármacos (FIG. 34F).

Si bien se desea que p53 citoplasmática promueva la muerte celular con la combinación de fármacos, se observó en algunos casos que tanto las funciones dependientes de la transcripción como las independientes de p53 son necesarias para la ejecución óptima de la apoptosis sinérgica con nutlina (FIG. 34F). Estos resultados son congruentes con los informes de que las funciones independientes de la transcripción de p53 pueden ejecutar por sí solas la apoptosis intrínseca, mientras que, en otros contextos, pueden requerir sus funciones dependientes de la transcripción para estimular la muerte celular mediada por p53 citoplasmática. En conjunto, los resultados descritos en la presente muestran que el direccionamiento combinado del metabolismo de glucosa impulsado por EGFR y p53 puede inducir una muerte celular sinérgica marcada en GBM primario; que depende de las funciones citoplasmáticas de p53.

Ejemplo 11: La modulación del metabolismo de la glucosa ceba a los no respondedores de EGFRi para la muerte celular mediada por p53

Los datos antes mencionados llevaron a los inventores a proponer un modelo en el que la atenuación del metabolismo de la glucosa mediada por EGFRi ceba la maquinaria apoptótica, lo que da como resultado una sinergia con estímulos proapoptóticos, tal como la activación de p53. La sinergia radica entre la inducción de estrés celular por inhibidores de EGFR, la reducción de la absorción de glucosa y el cebado de la célula para la apoptosis y la estabilización de p53 por antagonistas de BCL-2. La inhibición de EGFR puede atenuar rápidamente la glucólisis en el estrés celular. Esto crea una vulnerabilidad específica del tumor en la que la apoptosis intrínseca se puede potenciar significativamente mediante: 1) activación de p53 (como, por ejemplo, a través de nutlina, análogos u otros descritos en la presente) y 2) inhibición de BCL-2 (por cualquiera de varios agentes como se describen en la presente, tales como, por ejemplo, ABT-263 (Navitoclax).

Una predicción lógica de este modelo es que la inhibición directa del metabolismo de la glucosa debería fenocopiar los efectos de EGFRi. De acuerdo con esto, la adición del inhibidor metabólico de glucosa 2-desoxiglucosa (2DG) estimuló el cebado apoptótico, la unión de p53 a Bcl-xL y la sinergia con nutlina en las células HK301 (un respondedor metabólico de EGFRi) (Fig. 40A, 40B y 40D). Curiosamente, la inhibición de la fosforilación oxidativa con oligomicina (complejo V/ATP sintasa) o rotenona (complejo I) no se sinergizó con el tratamiento con nutlina en gliomaesferas de HK301 (FIG. 35C y 35D). Por lo tanto, el flujo metabólico de glucosa reducido solo, pero no el metabolismo oxidativo, parece ser suficiente para la sensibilidad sinérgica a la activación de p53.

Esto llevó a los inventores a considerar si la modulación del consumo de glucosa en los no respondedores de EGFRi da como resultado una vulnerabilidad dependiente de p53 similar. Para investigar esto, probaron si la inhibición directa de la absorción de glucosa, con 2DG, o

dirigiéndose a PI3K, un impulsor bien caracterizado del metabolismo de la glucosa, provoca un cebado apoptótico en dos no respondedores metabólicos de EGFRi (FIG. 25A). En contraste con el tratamiento con erlotinib, la inhibición aguda de PI3K con pictilisib anuló la señalización de PI3K-AKT-mTOR (FIG. 35E) y redujo significativamente la absorción de ^{18}F -FDG en células HK393 y HK254 (FIG. 25B). La disminución en el consumo de glucosa con pictilisib se asoció con un cebado apoptótico significativamente mayor y, como se anticipó, 2DG reflejó completamente estos efectos (FIG. 25B y C). Por lo tanto, los no respondedores metabólicos de EGFRi pueden estar preparados para la apoptosis después de la inhibición de la absorción de glucosa. Es importante destacar que el direccionamiento CRISPR/CAS-9 de p53 en HK393 suprimió significativamente el cebado mediado por 2DG o pictilisib (FIG. 25D). Además, el cebado dependiente de p53 se asoció con un aumento de la unión de Bcl-xL y p53, indicativo del secuestro de p53 por Bcl-xL para bloquear la apoptosis (FIG. 25E y FIG. 35F). De acuerdo con esta interpretación, la combinación de 2DG o pictilisib con nutlina provocó una letalidad sinérgica significativa dependiente de p53 en células no respondedoras de EGFRi (Figs. 25F y 25G). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la inhibición aguda del metabolismo de la glucosa, ya sea directamente o con terapia dirigida, promueve el cebado apoptótico dependiente de p53 en GBM; lo cual crea una vulnerabilidad a la que se puede atacar para mejorar la destrucción de células.

Ejemplo 12: Estrategia terapéutica combinatoria y biomarcador no invasivo para dirigirse a GBM *in vivo*

Los resultados obtenidos en cultivo celular muestran que el direccionamiento combinado del metabolismo de la glucosa impulsado por oncogén y p53 tiene actividad sinérgica en GBM primario. Esto llevó a los inventores a investigar si este enfoque podría ser eficaz en modelos de xenoinjertos de GBM ortotópicos. Para estos estudios, se empleó un potente inhibidor de MDM2, idasanutlina, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos para muchas neoplasias malignas. Dada la incertidumbre de la penetración del SNC para idasanutlina, primero se demostró que idasanutlina puede acumularse en el cerebro de ratones con una barrera hematoencefálica intacta (cerebro:plasma, 0,35) y estabiliza p53 en ratones portadores de tumores ortotópicos (Fig. 41A y 41B).

A continuación, como se requieren perturbaciones en el metabolismo de la glucosa con inhibición del oncogén para la sensibilidad sinérgica a la activación de p53, se razonó que la atenuación rápida en la absorción de glucosa *in vivo* después de la administración de EGFRi, medida por PET con ^{18}F -FDG, podría servir como un biomarcador predictivo no invasivo de la eficacia terapéutica del tratamiento combinado de erlotinib + idasanutlina (FIG. 26A). Se observó, en xenoinjertos ortotópicos de una gliomaesfera respondedora metabólica de EGFR (GBM39), que el tratamiento agudo con erlotinib (75 mg/kg) redujo rápidamente la absorción de ^{18}F -FDG (15 horas después de la administración de erlotinib) (FIG. 26B y FIG. 36C). En grupos separados de ratones, se probaron los fármacos individuales y la combinación de tratamiento diario con erlotinib (75 mg/kg) e idasanutlina (50 mg/kg). En relación con los controles de agente único, se observó una inhibición sinérgica del crecimiento, según lo determinado por la luciferasa de *gaussia* secretada, en ratones portadores de tumores intracraneales GBM39, con una toxicidad mínima (FIG. 26B y FIG. 36D). Por el contrario, los xenoinjertos ortotópicos de un

no respondedor metabólico (HK393) no mostraron cambios en la absorción de ^{18}F -FDG con EGFRi agudo (FIG. 26D y FIG. 36C), ni actividad sinérgica con la combinación de erlotinib e idasanutlina (FIG. 26E). Por lo tanto, la PET con ^{18}F -FDG no invasiva, utilizada para medir cambios rápidos en la absorción de glucosa con EGFRi, fue eficaz para predecir la sensibilidad sinérgica posterior a la combinación de erlotinib e idasanutlina.

Finalmente, se evaluaron los efectos de la combinación de fármacos sobre la supervivencia global en xenoinjertos ortotópicos de dos respondedores metabólicos de EGFRi (GBM39 y HK336) o dos no respondedores (HK393 y GS025). Todos los tumores eran de p53 de tipo salvaje (FIG. 29A). Tras la evidencia de crecimiento tumoral (según lo determinado por luciferasa de *gaussia*), los ratones se trataron con vehículo, erlotinib, idasanutlina o la combinación durante hasta 25 días. La combinación de fármacos condujo a un aumento pronunciado de la supervivencia solamente en los tumores de GBM respondedores metabólicos de EGFRi (Fig. 30F-I). Tomados en conjunto, estos datos muestran que el direccionamiento combinado de EGFR y p53 inhibe sinérgicamente el crecimiento y prolonga la supervivencia en un subconjunto de xenoinjertos ortotópicos de GBM de p53 de tipo salvaje. Es importante destacar que la PET con ^{18}F -FDG fue valiosa como un biomarcador predictivo no invasivo de sensibilidad a esta nueva estrategia terapéutica combinada.

Ejemplo 13: Inhibición directa de la glucólisis con 2DG o citocahalsina B

Se probó cómo la inhibición directa de la glucólisis con un inhibidor de hexocinasa (2DG) y un inhibidor del transportador de glucosa (citocalasina B) afecta la activación de p53 por nutlina. Los resultados mostrados en la FIG. 37 demuestran que la glucosa baja (0,25 mM) conduce a la muerte celular sinérgica con la inhibición de BCL-xL con navitoclax o nutlina. La muerte celular se midió mediante el uso de tinción con anexina V en muestras de gliomasfera tratadas durante 72 horas con inhibidores glucolíticos 2DG o citocalasina B como agentes únicos o en combinación con el activador de p53, nutlina. Los mismos efectos se recapitularon mediante el cultivo de gliomaesferas en condiciones de glucosa baja (0,25 mM) y tratándolas con nutlina o navitoclax (ABT-263) durante 72 horas.

Ejemplo 14: Procedimientos experimentales

Ratones

Se adquirieron hembras NOD *scid* gamma (NSG), de 6 a 8 semanas de edad, en la instalación de cría de animales del centro médico de la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA). Se adquirieron ratones CD-1 machos, de 6 a 8 semanas de edad, de Charles River. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones definidas libres de patógenos de flora en la instalación para animales aprobada por AAALAC de la División de animales de laboratorio (DLAM) en UCLA. Todos los experimentos con animales se realizaron con la aprobación de la Oficina de supervisión de recursos animales de UCLA (OARO).

Células de GBM derivadas del paciente

Todo el tejido del paciente para derivar cultivos de célulasde GBM se obtuvo mediante consentimiento informado explícito, mediante el uso del protocolo de la Junta de revisión institucional (IRB) de UCLA: 10-00065. Como se describió anteriormente¹², las células de GBM primarias se establecieron y mantuvieron en condiciones de gliomaesfera que consisten en DMEM/F12 (Gibco), B27 (Invitrogen), penicilina-estreptomicina (Invitrogen) y Glutamax

(Invitrogen) complementado con heparina (5 µg/mL, Sigma), EGF (50 ng/mL, Sigma) y FGF (20 ng/mL, Sigma). Todas las células se cultivaron a 37 °C, O₂ al 20% y CO₂ al 5% y se monitorearon de forma rutinaria y dieron negativo para la presencia de micoplasma mediante el uso de un kit disponible comercialmente (MycoAlert, Lonza). En el momento de los experimentos, la mayoría de las líneas de HK utilizadas tenían entre 20 y 30 pases (excepciones HK385 p8, HK336 p15), mientras que las líneas de GS y GBM39 tenían menos de 10 pases. Todas las células se autenticaron mediante análisis de repetición en tándem corto (STR)

Reactivos y anticuerpos

Se disolvieron inhibidores químicos de las siguientes fuentes en DMSO para estudios in vitro: erlotinib (Chemietek), nutlina-3A (Selleck Chemicals), WEHI-539 (APExBIO), pictilisib (Selleck Chemicals), oligomicina (Sigma), rotenona (Sigma). Se disolvió 2DG (Sigma) poco antes en medio antes de su uso. Los anticuerpos utilizados para la inmunotransferencia se obtuvieron de las fuentes enumeradas: β-actina (Cell signaling, 3700), tubulina (Cell signaling, 3873), p-EGFR Y1086 (Thermo Fischer Scientific, 36-9700), t-EGFR (Millipore, 06-847), t-AKT (Cell Signaling, 4685), p-AKT T308 (Cell Signaling, 13038), p-AKT S473 (Cell Signaling, 4060), t-ERK (Cell Signaling, 4695), p-ERK T202/Y204 (Cell Signaling, 4370), t-S6 (Cell Signaling, 2217), p-S6 S235/236 (Cell Signaling, 4858), t-4EBP1 (Cell Signaling, 9644), p-4EBP1 S65 (Cell Signaling 9451), Glut3 (Abcam, ab15311), Glut1 (Millipore, 07-1401), p53 (Santa Cruz Biotechnology, SC-126), BAX (Cell Signaling, 5023), BIM (Cell Signaling, 2933), Bcl-2 (Cell Signaling, 2870), Bcl-xL (Cell Signaling, 2764), Mcl-1 (Cell Signaling, 5453), citocromo c (Cell Signaling, 4272) y caspasa-3 escindida (Cell Signaling, 9661). Los anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación se obtuvieron de las fuentes enumeradas: p53 (Cell Signaling, 12450) y Bcl-xL (Cell Signaling, 2764). Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de las fuentes enumeradas: IgG anti-conejo unida a HRP (Cell Signaling, 7074) e IgG anti-ratón unida a HRP (Cell Signaling, 7076). Todos los anticuerpos de inmunotransferencia se utilizaron a una dilución de 1:1000, excepto la β-actina y la tubulina, que se utilizaron a 1:10 000. Los anticuerpos de inmunoprecipitación se diluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (1:200 para p53 y 1:100 para Bcl-xL). Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:5000.

Ensayo de absorción de ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (18F-FDG).

Las células se sembraron a 5 x 10⁴ células/mL y se trataron con fármacos designados para los puntos de tiempo indicados. Tras el tratamiento apropiado, las células se recogieron y se resuspendieron en DMEM/F12 sin glucosa (USBiológico) que contenía ¹⁸F-FDG (radiactividad 1 µCi/mL). Las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora y luego se lavaron tres veces con PBS enfriado con hielo. A continuación, se midió la radiactividad de cada muestra mediante el uso de un contador gamma.

Mediciones de glucosa, glutamina y lactato

El consumo de glucosa celular y la producción de lactato se midieron mediante el uso de un analizador básico Nova Biomedical BioProfile. Brevemente, las células se sembraron a 1 x 10⁵ células/mL en 2 mL de condiciones de gliomaesfera y condiciones apropiadas de fármacos (n=5). 12 horas después del tratamiento con el fármaco, se extrajo 1 mL de medio de cada muestra y se analizó en el analizador Nova BioProfile. Las medidas se normalizaron a la cantidad de células.

Ensayo de apoptosis de anexina V

Las células se recogieron y analizaron para determinar la tinción con anexina V y PI de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences). Brevemente, las células se sembraron a 5×10^4 células/mL y se trataron con fármacos apropiados. Después los puntos de tiempo indicados, las células se recogieron, se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se tiñeron con anexina V y PI durante 15 minutos. A continuación, las muestras se analizaron mediante el uso de el citómetro de flujo BD LSRII.

Inmunotransferencia

Las células se recogieron y lisaron en amortiguador RIPA (Boston BioProducts) que contenía Halt proteasa e inhibidor de fosfatasa (Thermo Fischer Scientific). Los lisados se centrifugaron a $14\,000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Las muestras de proteína se hirvieron luego en amortiguador de muestras NuPAGE LDS (Invitrogen) y agente reductor de muestras NuPAGE (Invitrogen) y se separaron mediante el uso de SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 12% (Invitrogen) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). La inmunotransferencia se realizó según las especificaciones del fabricante del anticuerpo y como se mencionó anteriormente. Las membranas se revelaron mediante el uso de el sistema SuperSignal (Thermo Fischer Scientific).

Inmunoprecipitación

Las células se recogieron, se lavaron una vez con PBS y se incubaron en amortiguador de lisis IP (Tris-HCL 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, glicerol al 5%) a 4°C durante 15 minutos. A continuación, se aclararon previamente 300-500 μg de cada muestra en microesferas de agarosa más proteína A/G (Thermo Fischer Scientific) durante una hora. Después de la limpieza previa, las muestras se incubaron con conjugados de anticuerpos y microesferas durante la noche de acuerdo con las especificaciones del fabricante y como se mencionó anteriormente. Luego, las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 1 min y las microesferas se lavaron con 500 μL de amortiguador de lisis IP cinco veces. Las proteínas se eluyeron de las perlas al hervir en 2x amortiguador de muestra LDS (Invitrogen) a 95°C durante 5 min. Las muestras se analizaron mediante inmunotransferencia como se describió anteriormente. Los anticuerpos de inmunoprecipitación se diluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (1:200 para p53 y 1:100 para Bcl-xL).

Perfilado dinámico de BH3

Las gliomaesferas de GBM se disociaron primero en suspensiones unicelulares con TrypLE (Gibco) y se resuspendieron en amortiguador MEB (manitol 150 mM HEPES-KOH 10 mM, KCl 50 mM, EGTA 0,02 mM, EDTA 0,02 mM, BSA al 0,1%, succinato 5 mM) . 50 μL de la suspensión celular (3×10^4 células/pocillo) se sembraron en pocillos de retención que portaban 50 μL de amortiguador MEB que contenía 0,002% de digitonina y péptidos indicados en placas de 96 pocillos. A continuación, las placas se incubaron a 25°C durante 50 min. Después, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min, seguido de neutralización con amortiguador N2 (Tris 1,7 M, glicina 1,25 M pH 9,1) durante 5 min. Las muestras se tiñeron durante la noche con 20 μL de solución de tinción (BSA al 10%, Tween 20 al 2% en PBS) que contenía DAPI y anti-citocromo c (BioLegend). Al día siguiente, se cuantificó la liberación de citocromo c mediante el uso de un citómetro de flujo BD LSRII. Las medidas se normalizaron a

los controles apropiados que no promueven la liberación del citocromo c (DMSO y péptido inactivo PUMA2A). El delta cebado se refiere a la diferencia en la cantidad de liberación de citocromo c entre las células tratadas con vehículo y las células tratadas con fármaco.

Oligomerización de BAX

- 5 Se trataron $7,5 \times 10^5$ células con los fármacos indicados. Después de 24 h de tratamiento, se recogieron las células, se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo y se resuspendieron en bismaleimidoheptano (BMH) 1 mM en PBS durante 30 min. A continuación, las células se sedimentaron y lisaron para inmunotransferencia, como se describió anteriormente.

Detección de citocromo c

- 10 5 millones de células se sembraron a una concentración de 1×10^5 células/mL y se trataron con los fármacos indicados. Después de 24 horas de tratamiento, se recogieron las células, se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo. A continuación, se realizó el fraccionamiento subcelular mediante el uso de un kit de aislamiento mitocondrial (Thermo Fischer Scientific, 89874). Ambas fracciones citoplasmáticas y mitocondriales se sometieron a
15 inmunotransferencia y el citocromo c se detectó mediante el uso de anticuerpo de citocromo c a una dilución de 1:1000 (Cell Signaling, 4272).

Estudios de xenoinjerto en ratón

- Para los experimentos intracraneales, se inyectaron células GBM39, HK336, HK393, y GS025 (4×10^5 células por inyección) en el cuerpo estriado derecho del cerebro de ratones NSG hembra
20 (6-8 semanas de edad). Las coordenadas de inyección fueron 2 mm lateral y 1 mm posterior al bregma, a una profundidad de 2 mm. La carga tumoral se controló mediante luciferasa de *gaussia* secretada y después de tres mediciones de crecimiento consecutivas, los ratones se asignaron al azar en cuatro grupos de tratamiento que consistían en vehículos apropiados, 75 mg/kg de erlotinib, 50 mg/kg de idasanutlina o una combinación de ambos fármacos. El vehículo
25 consistía en 0,5% de metilcelulosa en agua, que se usa para disolver erlotinib y una formulación propia obtenida de Roche, que se usa para disolver idasanutlina. La carga tumoral se evaluó dos veces por semana mediante luciferasa de *gaussia* secretada. Cuando fue posible, los ratones se trataron durante 25 días y se retiraron del tratamiento y se monitoreó su supervivencia. Los fármacos se administraron mediante sonda oral. Los tamaños de las
30 muestras se eligieron con base en estimaciones de experimentos piloto y resultados de la bibliografía previa¹². Los investigadores no estaban cegados a la asignación de grupos ni a la evaluación del resultado. Todos los estudios se realizaron de acuerdo con las pautas del protocolo OARO de UCLA.

Imagenología de ratón PET/TC retrasada intracraneal

- 35 Los ratones se trataron con la dosis y el tiempo indicados de erlotinib, luego se precalentaron, se anestesiaron con isoflurano al 2% y se les inyectaron por vía intravenosa 70 μ Ci de ^{18}F -FDG. Después de 1 hora de absorción inconsciente, los ratones se retiraron de la anestesia pero se mantuvieron calientes durante otras 5 horas de absorción. 6 horas después de la administración inicial de ^{18}F -FDG, se obtuvieron imágenes de los ratones mediante el uso de un escáner G8
40 PET/CT (Sofie Biosciences). Según lo anterior, la cuantificación se realizó al dibujar regiones de interés (ROI) en 3D mediante el uso de el software AMIDE.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó en secciones de 4 µm que se cortaron de bloques FFPE (fijados con formalina, incrustados en parafina). A continuación, las secciones se desparafinaron con xileno y se rehidrataron a través de etanol graduado. La recuperación de antígenos se logró con un Decloaker Nuclear (Biocare Medical) de pH 9,5 en una olla a presión de Decloaking a 95 ° C durante 40 min. A continuación, las secciones de tejido se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% (LOTE 161509; Fisher Chemical) y con Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, EE. UU.) para reducir la tinción de fondo inespecífica. El anticuerpo primario para p53 (Cell Signalling, 2527) se aplicó en una dilución 1:150 durante 80 min seguido de detección con el kit de detección de polímeros MACH 3 Rabbit HRP (Biocare Medical). La visualización se logró mediante el uso de VECTOR NovaRED (SK-4800; Vector Laboratories, Inc.) como cromógeno. Por último, las secciones se contratiñeron con hematoxilina automatizada de Tacha (Biocare Medical).

RT-PCR cuantitativa

Se extrajo ARN de todas las células mediante el uso de el kit de ARN Purelink (Invitrogen). El ADNc se sintetizó con el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en el Roche LightCycler 480 mediante el uso de SYBRGreen Master Mix (Kapa Biosciences). Los valores de expresión relativa se normalizan al gen de control (*GAPDH*). Las secuencias de cebador son como se enumeran (de 5' a 3'): *P21* (directo GACTTTGTCACCGAGACACC, inverso GACAGGTCCACATGGTCTTC), *PUMA* (directo ACGACCTCAACGCACAGTACG, inverso GTAAGGGCAGGAGTCCCATGATG), *GAPDH* (directo TGCCATGTAGACCCCTTGAAG, inverso ATGGTACATGACAAGGTGCGG), *MDM2* (directo CTGTGTTCAAGTGGCGATTGG, inverso AGGGTCTCTTGTTCGAAGC), *TIGAR* (directo GGAAGAGTGCCCTGTGTTTAC, inverso GACTCAAGACTTCGGGAAAGG), *PIG3* (directo GCAGCTGCTGGATTCAATTA, inverso TCCCAGTAGGATCCGCCTAT).

Actividad indicadora de P53

Las células se infectaron primero con lentivirus sintetizado a partir de un plásmido indicador de p53 que codifica luciferasa bajo el control de un elemento sensible a p53: TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGTGCCTTGCCTGGACTTGCCTGGCCTTGCCTTGGG. Después, las células infectadas se sembraron en placas de 96 pocillos a 5000 células/50 µL y se trataron con los fármacos indicados durante 24 horas y luego se incubaron con D-luciferina 1 mM durante dos horas. La bioluminiscencia se midió mediante el uso de IVIS Lumina II (Perkin Elmer).

Manipulación genética

En general, los lentivirus utilizados para la manipulación genética se produjeron mediante transfección de células 293-FT (Thermo) mediante el uso de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). El virus se recogió 48 horas después de la transfección. El vector lentiviral sgp53 y el vector sgControl contenían el siguiente ARN guía, respectivamente: CCGGTTTCATGCCGCCCCATGC y GTAATCCTAGCACTTTTAGG. Se utilizó LentiCRISPR-v2 como estructura principal. El ADNc de Glut1 y Glut3 se clonó a partir de vectores disponibles comercialmente y se incorporó en la estructura principal lentiviral pLenti-GLuc-IRES-EGFP que contenía un promotor de CMV (Glut1 fue un obsequio de Wolf Frommer (Addgene n.º 18085⁴⁴), Glut3 se obtuvo de OriGene n.º SC115791, y la estructura principal lentiviral se obtuvo de Targeting Systems n.º GL-GFP). El

pMIG Bcl-xL fue un obsequio de Stanley Korsmeyer (Addgene n.º 8790⁴⁵) y se clonó en la estructura principal lentiviral mencionada anteriormente (Targeting Systems). Las construcciones de p53 citoplasmática (K305A y R306A) y de tipo salvaje fueron un amable obsequio de R. Agami y G. Lahav. Los genes de interés se clonaron en un vector lentiviral que contenía un promotor de PGK. Las construcciones para los mutantes del dominio de unión a ADN de p53 (R175H) y (R273H) así como el mutante nuclear (L348A y L350A) se generaron mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio (New England Biolabs n.º E0554S) en la construcción de p53 de tipo salvaje.

Para los experimentos de eliminación de EGFR, se transfectó ARNip contra EGFR (Thermo Fischer Scientific, s563) en células mediante el uso de DharmaFECT 4 (Dharmacon). Después de 48 horas, las células se recogieron y se usaron para los experimentos indicados.

Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia, las gliomasferas se disociaron primero en una sola célula y se adhirieron a las placas de 96 pocillos mediante el uso de Cell-Tak (Corning) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las células adheridas se fijaron con metanol enfriado con hielo durante 10 min y luego se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se incubaron con solución de bloqueo que contenía FBS al 10% y BSA al 3% en PBS durante 1 hora y posteriormente se incubaron con anticuerpo de p53 (Santa Cruz, SC-126, dilución 1:50) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células se incubaron con anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647, dilución 1:2000) durante una hora y tinción DAPI durante 10 minutos, luego se tomaron imágenes mediante el uso de un microscopio Nikon TI Eclipse equipado con una cámara fluorescente Cascade II (Roper Scientific). Se obtuvieron imágenes de las células con emisiones a 461 nm y 647 nm y luego se procesaron mediante el uso de el software de análisis NIS-Elements AR.

Mediciones de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR)

Para las mediciones metabólicas que implican OCR y ECAR, las gliomaesferas tratadas con los fármacos indicados se disociaron primero en suspensiones de células individuales y se adhirieron a placas XF24 (Seahorse Bioscience) mediante el uso de Cell-Tak (Corning) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes del ensayo, las células se complementaron con DMEM sin amortiguador y se incubaron a 37 °C durante 30 min antes de iniciar las mediciones de OCR y ECAR. Se muestran las mediciones de ECAR basal entre las células de control y las tratadas con erlotinib.

Preparación de muestras de espectroscopia de masas

Se trataron ratones CD-1 machos (6-8 semanas de edad) con 50 mg/kg de idasanutlina por duplicado mediante sonda oral. A las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la administración, se sacrificaron los ratones, se extrajo sangre mediante sangrado retroorbital y se recogió tejido cerebral. La sangre entera de los ratones se centrifugó para aislar el plasma. Se aisló idasanutlina mediante extracción líquido-líquido del plasma: se añadieron 50 µL de plasma a 2 µL de patrón interno y 100 µL de acetonitrilo. Se lavó tejido cerebral de ratón con 2 mL de PBS frío y se homogeneizó mediante el uso de un homogeneizador de tejidos con 2 mL de PBS frío fresco. A continuación, se aisló y reconstituyó idasanutina de una manera similar

mediante extracción líquido-líquido: se añadieron 100 µL de homogeneizado cerebral a 2 µL de patrón interno y 200 µL de acetonitrilo. Después de mezclar en vórtice, las muestras se centrifugaron. El sobrenadante se eliminó y se evaporó en un evaporador rotatorio y se reconstituyó en 100 µL 50:50 de agua: acetonitrilo.

5 *Detección de idasanutlina mediante espectrometría de masas*

Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna Phenomenex Kinetex C18 de 100 x 2,1 mm (Kinetex) mediante el uso del sistema LC 1290 Infinity (Agilent). La fase móvil estaba compuesta por solvente A: ácido fórmico al 0,1% en agua Milli-Q y B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. Los analitos se eluyeron con un gradiente de B al 5% (0-4 min), B al 5-99% (4-32 min), B al 99% (32-36 min), y luego se volvieron a colocar en B al 5% durante 12 min para reequilibrar entre inyecciones. Se utilizaron inyecciones de 20 µL en el sistema cromatográfico con una velocidad de flujo de solvente de 0,10 mL/min. La espectrometría de masas se realizó en el sistema LC/MS de triple cuadrupolo 6460 (Agilent). La ionización se logró mediante el uso de electropulverización en el modo positivo y la adquisición de datos se realizó en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La transición de MRM utilizada para la detección de idasanutlina fue m/z 616,2 $\rightarrow$ 421,2 con voltaje del fragmentador de 114V y energía de colisión de 20 eV. La señal del analito se normalizó al estándar interno y las concentraciones se determinaron por comparación con la curva de calibración (0,5, 5, 50, 250, 500, 2000 nM). Las concentraciones cerebrales de idasanutlina se ajustaron en un 1,4% del peso del cerebro del ratón para la sangre residual en la vasculatura cerebral.

20 *Medidas de luciferasa de gaussia secretada*

Las células se infectaron con un vector lentiviral que contenía el gen indicador de luciferasa de *Gaussia* secretada (sGluc) (Targeting Systems n.º GL-GFP) y por vía intracraneal mediante la implantación en el cuerpo estriado derecho de los ratones (4×10^5 células/ratón). Para medir los niveles de luciferasa de *Gaussia* secretada (sGluc), se recogieron 6 µL de sangre de la vena de la cola de los ratones y se mezclaron inmediatamente con EDTA 50 mM para evitar la coagulación. La actividad de Gluc se obtuvo al medir la quimioluminiscencia después de la inyección de 100 µL de coelentarazina 100 µM (Nanolight) en una placa de 96 pocillos.

Cálculos de puntuación de sinergia

30 $1,0 \times 10^5$ células de GBM se sembraron por triplicado y se trataron con erlotinib, nutlina o combinación en múltiples concentraciones mediante el uso de una matriz donde cada fármaco se añadió a las células a seis concentraciones (0-10 µM). La tinción con anexina V se midió después de 72 horas de tratamiento. Con el software Chalice, se comparó la respuesta de la combinación con la de sus agentes individuales. Los efectos combinatorios se calcularon mediante el uso de la puntuación de sinergia.

Secuenciación de ADN

Se realizó una secuenciación dirigida para las muestras de HK206, HK217, HK250, HK296 para los siguientes genes *BCL11A*, *BCL11B*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *EGFR*, *ERBB2*, *IDH1*, *IDH2*, *MSH6*, *NF1*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN*, *RB1*, *TP53* mediante el uso de Illumina Miseq. Hubo de 40 1 a 2 millones de lecturas por muestra con una cobertura promedio de 230 por gen. Las variantes del número de copias se determinaron para estas muestras mediante el uso de una matriz de SNP de genoma completo. El perfil genético de GBM39 se ha descrito previamente

en la bibliografía.

La secuenciación del exoma completo se realizó para las muestras de HK157, HK229, HK248, HK250, HK254, HK296, HK301, HK336, HK350, HK390, HK393 y se llevó a cabo en SeqWright. Las muestras se agruparon en 2 grupos con reacciones de captura separadas. Se utilizó la

5 captura rápida de Nextera y la preparación de la biblioteca y la secuenciación se realizó en un HiSeq 2500, 2x100 pb con cobertura 100x en el objetivo, 2 ejecuciones rápidas completas, cada una con 1 control diploide normal. El análisis del número de copias de estas muestras se llevó a cabo mediante el uso del software EXCAVATOR.

Anotación de muestras de TCGA

- 10 Se analizaron 273 muestras de GBM de TCGA para detectar alteraciones genéticas en las vías de EGFR, p53 y reguladas por p53. Se examinaron las co-ocurrencias de mutaciones y solo se muestran interacciones significativas. Los datos se analizaron mediante el uso de cBioPortal como se describió anteriormente.

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

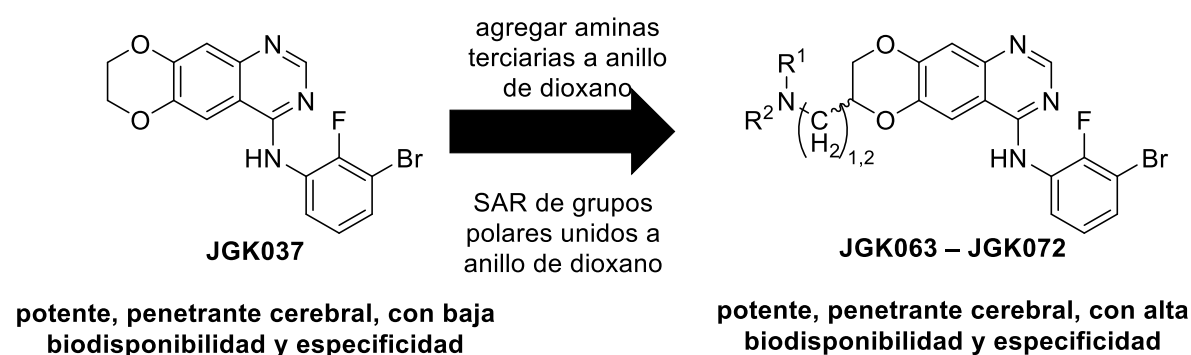
- 15 La hibridación fluorescente in situ (FISH) se realizó mediante el uso de una sonda de EGFR (rojo)/CEP 7 (verde) de dos colores marcada con fluorescencia disponible comercialmente (Abbott-Molecular). La hibridación FISH y los análisis se realizaron en líneas celulares, siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. Las células se contratiñeron con DAPI y se obtuvieron imágenes de las señales de la sonda fluorescente con un microscopio fluorescente
- 20 Zeiss (Axiophot) equipado con filtros de colores dobles y triples.

Análisis estadístico.

- Las comparaciones se realizaron mediante el uso de pruebas *t* de Student no pareadas de dos colas y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se asumió que todos los datos de múltiples experimentos independientes tenían una varianza normal. Los
- 25 datos representan valores medios $\pm$ s.e.m. Todos los análisis estadísticos se calcularon mediante el uso de Prism 6,0 (GraphPad). Para todos los experimentos *in vitro* e *in vivo*, no se utilizó ningún método estadístico para predeterminar el tamaño de la muestra y no se excluyeron muestras. Para las mediciones de tumores *in vivo*, se utilizaron los últimos conjuntos de datos para las comparaciones entre grupos. Tal como se describió anteriormente, todos los ratones
- 30 se asignaron al azar antes de los estudios.

Ejemplo 15: Diseño ilustrativo racional para determinados compuestos de la serie JGK

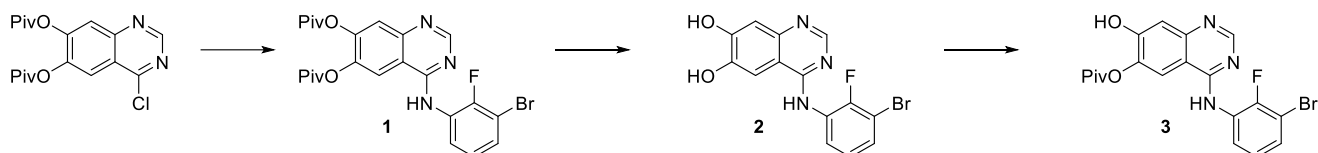
Determinados compuestos de la presente descripción se diseñaron de acuerdo con el esquema 1.



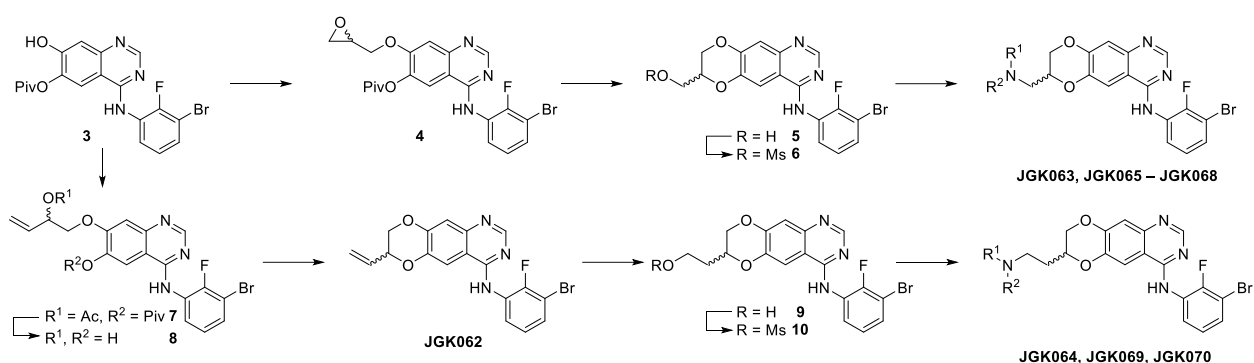
- 35 Esquema 1.

Ejemplo 16: Preparación de compuestos ilustrativos adicionales de la serie JGK

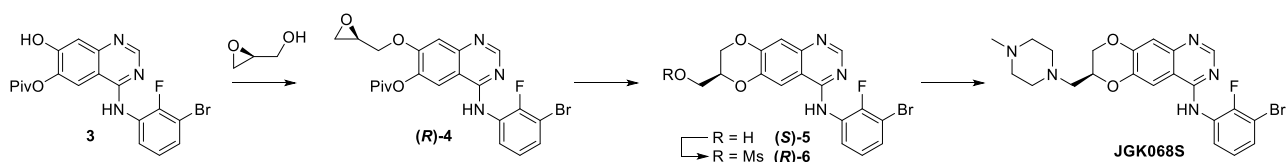
Los compuestos ilustrativos de la presente descripción se prepararon de acuerdo con los siguientes métodos.



5 **Esquema 1.** Síntesis del intermedio de quinazolina monoprotegido **3**.

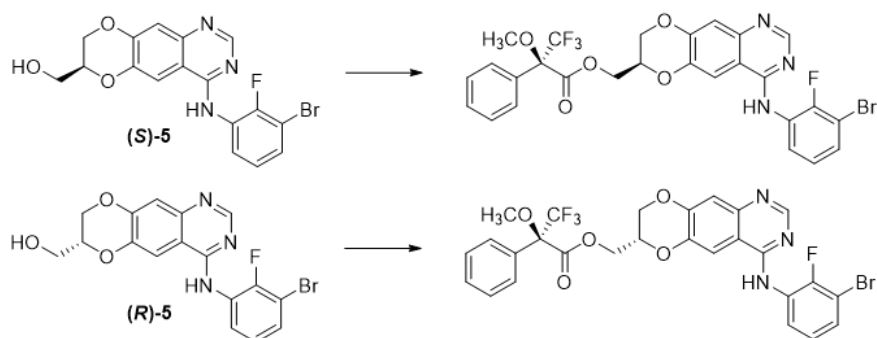


Esquema 2. Síntesis de JGK063 - JGK070.



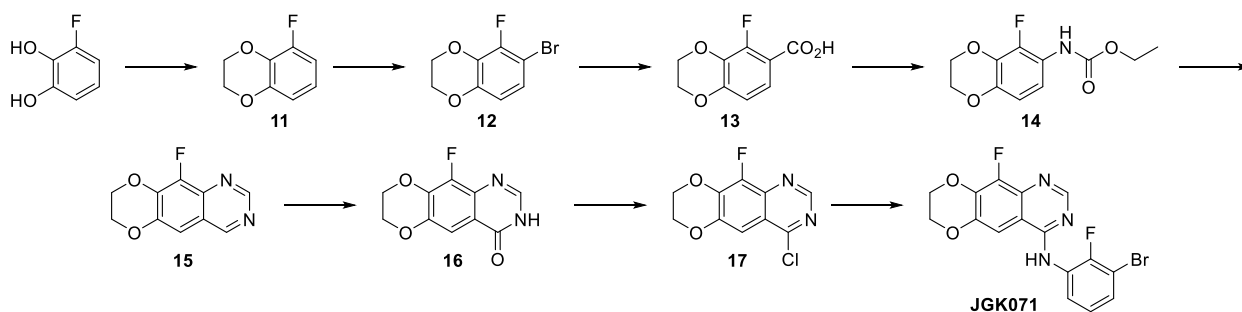
10

Esquema 3. Síntesis de **JGK068S** ((S) -**JGK068**). La síntesis se realizó de la misma forma que para la muestra racémica de **JGK068** ((±) -**JGK068**), pero con (S)-(-)-glicidol enantioméricamente puro. El otro enantiómero **JGK068R** ((R)-**JGK068**) se preparó mediante el uso de (R)-(+)-glicidol (no mostrado).



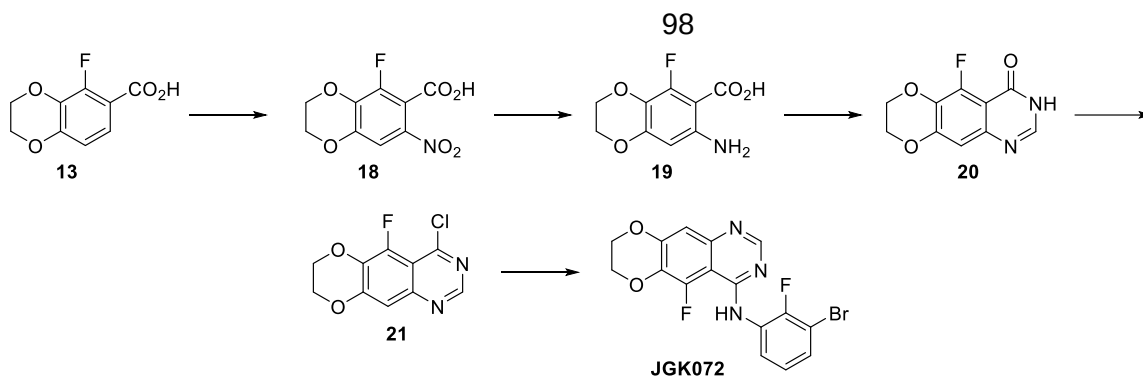
15

Esquema 4. La pureza enantiomérica del intermedio sintético **5** se determinó mediante SFC quiral (columna Chiralpak AD-3, MeOH al 40%) y por comparación de los espectros de ^{19}F NMR de los derivados de éster de Mosher de **5** (FIG. 39).

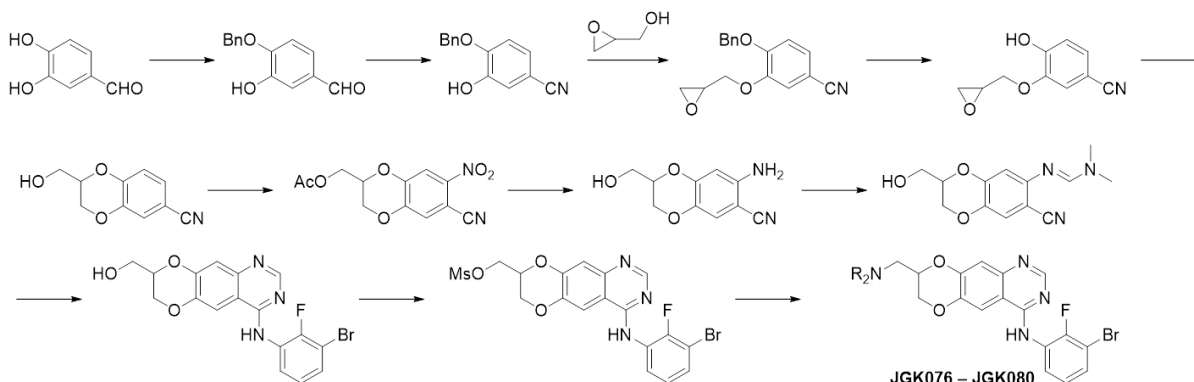


20

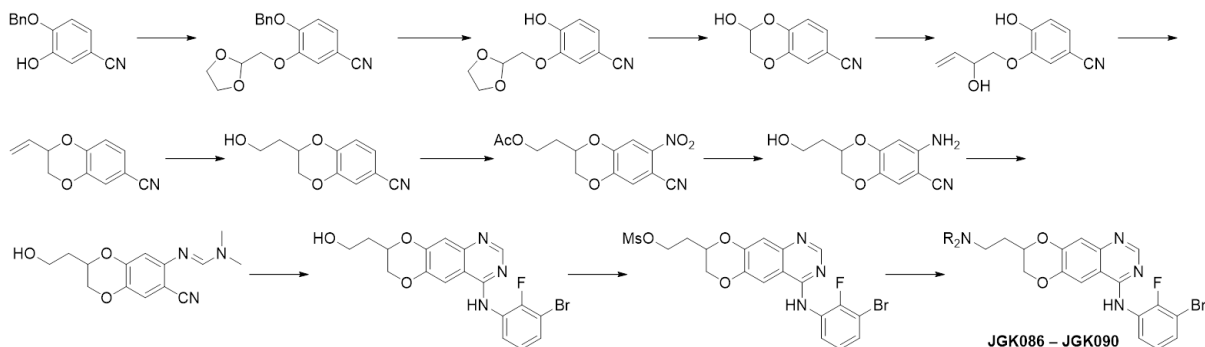
Esquema 5. Síntesis de **JGK071**.



Esquema 6. Síntesis de JGK072.



Esquema 7. Síntesis de JGK076 – JGK080.



Esquema 8. Síntesis de JGK086-JGK090.

Información química general

Todos los químicos, reactivos y solventes se adquirieron de fuentes comerciales cuando estuvieran disponibles y se utilizaron tal cual se recibieron. Cuando fue necesario, los reactivos y solventes se purificaron y secaron mediante métodos estándar. Las reacciones sensibles al aire y a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera inerte de argón en material de vidrio secado al horno. Las reacciones irradiadas con microondas se llevaron a cabo en un sintetizador de microondas CEM Discover de reactor de modo simple. Las reacciones a temperatura ambiente (T.A.) se llevaron a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Todas las reacciones se controlaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ precubiertas, donde las manchas se visualizaron mediante luz UV ($\lambda = 254, 365 \text{ nm}$) o mediante el uso de una solución de KMnO₄ alcalina. La cromatografía en columna ultrarrápida (FC) se llevó a cabo en SiO₂ 60 (tamaño de partícula 0,040–0,063 mm, 230–400 mesh). La cromatografía en capa fina preparativa (PTLC) se llevó a cabo con placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, 210-270 mm) o placas de gel de sílice GF TLC Analtech Silica (20 x 20 cm, 1000 mm). La concentración a presión reducida (al vacío) se realizó mediante evaporación rotatoria a 23–50 °C. Los compuestos purificados se secaron adicionalmente al alto vacío o en un desecador. Los rendimientos corresponden a compuestos purificados y no se optimizaron adicionalmente. Los espectros de resonancia magnética nuclear

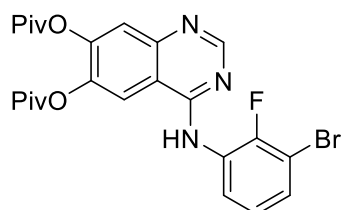
de protones (^1H RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (que funcionan a 300, 400 o 500 MHz). Los espectros de NMR de carbono (^{13}C RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (ya sea a 400 ó 500 MHz). Los desplazamientos químicos de NMR (δ ppm) se

referenciaron a las señales de solvente residual. Los datos de ^1H NMR se informan como sigue: desplazamiento químico en ppm; multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, quint = quinteto, m = multiplete/patrón complejo, td = triplete de dobletes, ddd = doblete de dobletes, br = señal amplia); constantes de acoplamiento (J) en Hz, integración. Los datos para espectros de ^{13}C NMR se informan en términos de desplazamiento químico y de constantes de acoplamiento aplicables. Los datos de espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrometro de masas Thermo Fisher Scientific Exactive Plus con fuente IonSense ID-CUBE DART o en un espectrometro de masas Waters LCT Premier con ACQUITY UPLC con automuestreador.

Procedimientos generales (GP).*GP-1: sustitución nucleofílica de mesilatos de quinazolinilo con aminas secundarias.* Se trató una mezcla de mesilato de quinazolinilo (1 equiv.) en DMF (0,05 M) con la amina secundaria (5 equiv.) y trietilamina (2 equiv.), y la mezcla se agitó a 85 °C durante 24 h. La mezcla se enfrió hasta 23 °C y se evaporó. El residuo se disolvió en EtOAc (20 mL), se lavó con NaOH 10 mM (4 x 5 mL), salmuera (5 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por FC o PTLC proporcionó los productos deseados típicamente como espumas blancuzcas y friables.

GP-2: sustitución aromática nucleofílica de 4-cloroquinazolina con anilinas. Se trató una mezcla de 4-cloroquinazolina (1 equiv.) en acetonitrilo (0,1 M) con anilina (2 equiv.) y con una solución de HCl 4 M en dioxano (1 equiv.). La mezcla se calentó a 80 °C bajo irradiación con microondas durante 30 min. La mezcla se concentró a presión reducida o la sal de clorhidrato de 4-anilinoquinazolina precipitada se aisló por filtración (lavados con Et_2O). El residuo se suspendió en NaHCO_3 ac. sat. y se extrajo con CH_2Cl_2 (3x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, salmuera, se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron. La purificación por FC (elución con un gradiente de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ o hexanos/ EtOAc) proporcionó los productos deseados típicamente como sólidos de color blanco a blancuzco o amarillo pálido.

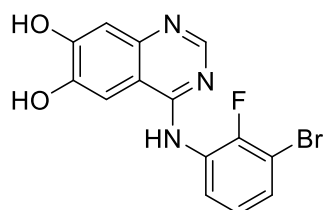
bis(2,2-dimetilpropanoato) de 4-(3-bromo-2-fluoroanilino)quinazolin-6,7-diilo (1).



Una mezcla de bis (2,2-dimetilpropanoato) de 4-cloroquinazolin-6,7-diilo¹ (41,08 g, 113 mmol) en *i*PrOH (450 mL) se trató con 3-bromo-2-fluoroanilina (17,05 mL, 152 mmol) y se agitó a 80 °C durante 3,5 h. La mezcla se enfrió hasta 23 °C y se evaporó. El residuo se resuspendió varias veces en hexanos (50 mL) y se concentró y luego se secó bajo HV. El residuo se recristalizó en EtOH para proporcionar un sólido amarillo, que se suspendió en NaHCO_3 sat. ac. (1 L) y se extrajo con DCM (3 x 550 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (400 mL), salmuera (400 mL), se secaron (MgSO_4), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título **1** (35,057 g, 60%) como una espuma amarilla friable.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,76 (s, 1H), 8,46 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,56 (br, 1H), 7,32 (ddd, J = 8,0, 6,4, 1,5 Hz, 1H), 7,11 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 1,40 (s, 9H), 1,39 ppm (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 176,13, 175,55, 156,71, 154,96, 150,69 (d, J_{CF} = 243,7 Hz), 148,75, 147,83, 142,45, 128,27, 127,86 (d, J_{CF} = 10,8 Hz), 125,29 (d, J_{CF} = 4,7 Hz), 122,70, 122,51, 114,43, 113,21, 108,84 (d, J_{CF} = 19,4 Hz), 39,54, 39,51, 27,40, 27,32 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{BrFN}_3\text{O}_4^+$, 518,1085; hallada, 518,1072.

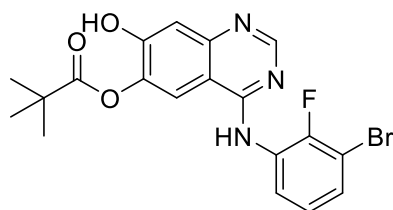
4-(3-bromo-2-fluoroanilino)quinazolin-6,7-diol (**2**).



Se trató una suspensión agitada de **1** (34,988 g, 67,5 mmol) a 0 °C con una solución de NH_3 7 M en MeOH (241 mL, 1,69 mol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min y entonces se agitó a 23 °C durante 4,5 h. La mezcla se evaporó y el residuo se suspendió en agua (400 mL), se agitó durante la noche y se filtró. El residuo se lavó con agua (500 mL), acetonitrilo (100 mL), DCM (4 x 150 mL), Et_2O (2 x 150 mL) y se secó en un desecador para proporcionar el compuesto del título **2** (23,68 g, cuant.) como un polvo de color amarillo pálido.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8,18 (s, 1H), 7,59 – 7,47 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,16 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 6,87 ppm (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 156,43, 156,12, 153,06 (d, J_{CF} = 246,7 Hz), 151,34, 148,39, 146,80, 129,23, 129,01, 127,12, 125,23 (d, J_{CF} = 4,3 Hz), 108,47, 108,32, 107,09, 103,04 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$, 349,9935; hallada, 349,9923.

2,2-dimetilpropanoato de 4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7-hidroxiquinazolin-6-ilo (**3**).

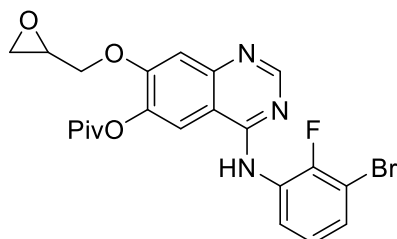


Una suspensión agitada de **2** (3500 mg, 10,0 mmol) en DMF (52,6 mL) se trató con Et_3N (5,57 mL, 40,0 mmol), se enfrió hasta -40 °C y se trató por goteo con Piv_2O (3,14 mL, 15,5 mmol). La mezcla se agitó a -40 °C durante 1 h, después de lo cual se retiró el baño de enfriamiento y se continuó agitando durante 2,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (500 mL), se lavó con ácido cítrico al 10% (2 x 50 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. FC (DCM/ EtOAc 1:1 $\rightarrow$ 0:1) proporcionó un sólido, que se redisolvió en EtOAc (750 mL) y se lavó con NH_4Cl semi-sat. ac. (4 x 75 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó para proporcionar el compuesto del título **3** (2,844 g, 66%) en como un sólido de color beige amarillento.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 11,00 (br, 1H), 9,70 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,59 (ddd, J = 8,0, 6,2, 1,6 Hz, 1H), 7,53 (ddd, J = 8,3, 7,1, 1,6 Hz, 1H), 7,21 (td, J = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 7,17 (s, 1H), 1,36 ppm (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 175,93, 157,68, 154,61, 154,53, 153,34 (d, J_{CF} = 247,3 Hz), 149,80, 139,65, 130,14, 127,92 (d, J_{CF} = 12,9 Hz), 127,62, 125,47 (d, J_{CF} = 4,4 Hz), 116,36, 111,00, 108,55 (d, J = 20,0 Hz), 107,77, 38,64, 26,93 ppm.

HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{19}H_{18}BrFN_3O_3^+$, 434,0510; hallada, 434,0489.

2,2-dimetilpropanoato de $(\pm)$ -4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7-[(oxiran-2-il)metoxi]quinazolin-6-il $((\pm)$ -**4**).



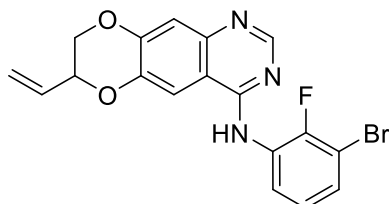
5

Una mezcla de **3** (1350 mg, 3,11 mmol) y PPh_3 (2038 mg, 7,77 mmol) en THF (21 mL) se trató con glicidol (495 μ L, 7,46 mmol), se enfrió hasta 0 °C y se trató con DIAD (1,47 mL, 7,46 mmol) durante 10 min. La mezcla se agitó a 23 °C durante 2,5 h y se concentró. FC (DCM/EtOAc 9:1 $\rightarrow$ 4:6) proporcionó el compuesto del título $(\pm)$ -**4** (848 mg, 56%) como un sólido blancuzco.

10 ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,73 (s, 1H), 8,54 (ddd, J = 8,6, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,45 (br, 1H), 7,30 (ddd, J = 8,2, 6,4, 1,5 Hz, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,11 (td, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,34 (dd, J = 10,8, 3,0 Hz, 1H), 3,99 (dd, J = 10,8, 6,2 Hz, 1H), 3,35 (ddt, J = 6,2, 4,1, 2,8 Hz, 1H), 2,92 (dd, J = 4,8, 4,1 Hz, 1H), 2,74 (dd, J = 4,8, 2,6 Hz, 1H), 1,45 ppm (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 176,87, 156,46, 155,10, 154,93, 150,41 (d, J_{CF} = 243,3 Hz), 150,27, 140,99, 128,25 (d, J_{CF} = 10,5 Hz), 127,75, 125,28 (d, J_{CF} = 4,7 Hz), 122,22, 114,02, 109,72, 109,49, 108,74 (d, J_{CF} = 19,1 Hz), 70,05, 49,55, 44,56, 39,45, 27,38 ppm. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{22}H_{22}BrFN_3O_4^+$, 490,0772; hallada, 490,0764.

15

$(\pm)$ -N-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-etenil-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-amina $((\pm)$ -**JGK062**).



20

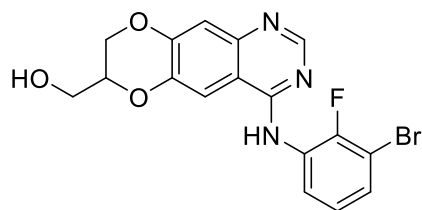
Una solución de PPh_3 (832 mg, 3,17 mmol) y DIAD (624 μ L, 3,17 mmol) en THF (23 mL) se agitó a 0 °C durante 15 min y luego se añadió por goteo a una solución de $(\pm)$ -**8** (1149 mg, 2,73 mmol) en THF (27 mL) durante 10 min a 0 °C. La mezcla se agitó a 0 ° durante 2 h y se evaporó. FC (hexanos/EtOAc 9:1 $\rightarrow$ 4:6) seguida de otra FC (DCM/EtOAc 1:0 $\rightarrow$ 6:4) proporcionó el compuesto del título $(\pm)$ -**JGK062** (1115 mg, cuant.) como una espuma friable de color blancuzco.

25

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,68 (s, 1H), 8,65 (ddd, J = 8,2, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,37 (br, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,27 (ddd, J = 8,0, 6,4, 1,5 Hz, 1H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 5,95 (ddd, J = 17,3, 10,7, 5,8 Hz, 1H), 5,60 (dt, J = 17,3, 1,2 Hz, 1H), 5,48 (dt, J = 10,7, 1,1 Hz, 1H), 4,82 – 4,74 (m, 1H), 4,42 (dd, J = 11,5, 2,5 Hz, 1H), 4,09 ppm (dd, J = 11,6, 8,1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 155,90, 153,38, 150,14 (d, J = 242,4 Hz), 149,12, 146,70, 144,12, 131,48, 128,64 (d, J = 10,3 Hz), 127,24, 125,30 (d, J = 4,7 Hz), 121,76, 120,43, 114,29, 110,69, 108,58 (d, J = 19,3 Hz), 106,06, 74,03, 67,84 ppm. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{18}H_{14}BrFN_3O_2^+$, 402,0248; hallada, 402,0233.

30

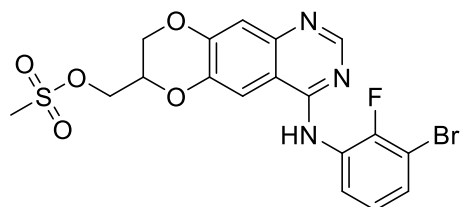
(±)-[4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-7-il]metanol ((±)-5).



Se trató una mezcla de (±)-4 (842 mg, 1,72 mmol) en MeOH (31 mL) con K₂CO₃ (482 mg, 3,49 mmol), se agitó a 23 °C durante 10,5 h y se concentró. El residuo se suspendió en NH₄Cl semi-sat. ac. (130 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (20 mL), salmuera (20 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título (±)-5 (720 mg, cuant.) como un sólido amarillo.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,59 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,59 (ddd, *J* = 8,0, 6,2, 1,6 Hz, 1H), 7,55 (ddd, *J* = 8,4, 7,0, 1,6 Hz, 1H), 7,24 – 7,18 (m, 1H), 7,21 (s, 1H), 5,16 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,49 (dd, *J* = 11,5, 2,4 Hz, 1H), 4,34 (dtd, *J* = 7,6, 5,2, 2,3 Hz, 1H), 4,21 (dd, *J* = 11,5, 7,4 Hz, 1H), 3,76 – 3,64 ppm (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 157,20, 153,35 (d, *J*_{CF} = 247,5 Hz), 153,10, 148,88, 145,95, 143,39, 130,11, 128,05 (d, *J*_{CF} = 13,0 Hz), 127,73, 125,44 (d, *J*_{CF} = 4,4 Hz), 112,33, 109,79, 108,56 (d, *J*_{CF} = 20,0 Hz), 108,37, 73,78, 65,50, 59,78 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₇H₁₄BrFN₃O₃⁺, 406,0197; hallada, 406,0185.

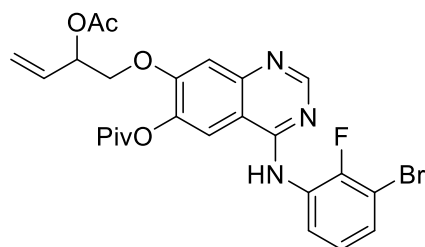
Metanesulfonato de (±)-[4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-7-il]metilo ((±)-6).



Una solución de (±)-5 (688 mg, 1,69 mmol) en THF (14 mL) se trató con Et₃N (357 µL, 2,56 mmol), se enfrió hasta 0 °C y se trató por goteo con MsCl (174 µL, 2,24 mmol). La mezcla se agitó a 23 °C durante 16 h, se enfrió hasta 0 °C y se trató con un NaHCO₃ sat. ac. (120 mL) y se extrajo con DCM (3 x 120 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (100 mL), salmuera (100 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron. FC (DCM/EtOAc 8:2 → 3:7) proporcionó el compuesto del título (±)-6 (496 mg, 61%) como un sólido blancuzco.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,69 (s, 1H), 8,60 (ddd, *J* = 8,5, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,39 (br, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,29 (ddd, *J* = 8,1, 6,5, 1,5 Hz, 1H), 7,11 (td, *J* = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,63 (dtd, *J* = 7,2, 4,9, 2,5 Hz, 1H), 4,52 (dd, *J* = 4,9, 0,9 Hz, 2H), 4,49 (dd, *J* = 11,8, 2,5 Hz, 1H), 4,29 (dd, *J* = 11,8, 7,1 Hz, 1H), 3,13 ppm (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 156,02, 153,66, 150,28 (d, *J*_{CF} = 242,9 Hz), 148,65, 146,80, 143,09, 128,43 (d, *J*_{CF} = 10,4 Hz), 127,54, 125,32 (d, *J*_{CF} = 4,7 Hz), 122,01, 114,77, 110,90, 108,66 (d, *J*_{CF} = 19,4 Hz), 106,44, 71,10, 66,46, 64,77, 38,02 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₈H₁₅BrFN₃O₅S⁺, 483,9973; hallada, 483,9950.

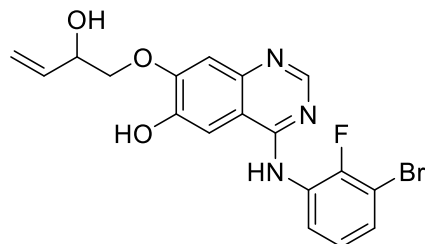
2,2-dimetilpropanoato de (±)-4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7-[[2-(acetoxi)but-3-en-1-il]oxi]quinazolin-6-ilo ((±)-7).



Una mezcla de **3** (2,639 mg, 6,08 mmol) y PPh₃ (3,986 mg, 15,2 mmol) en THF (41 mL) se trató con acetato de 1-hidroxibut-3-en-2-olracémico² (1,7 mL, 13,7 mmol), se enfrió hasta 0 °C y se trató por goteo con DIAD (2,7 mL, 13,7 mmol). La mezcla se agitó a 23 °C durante 3 h y se concentró. FC (DCM/EtOAc 1:0 → 6:4) proporcionó (±)-**7** en bruto (5,508 g, rendimiento estimado 60%) como un sólido blancuzco, que estaba contaminado con el Ph₃PO restante. El material se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,74 (s, 1H), 8,53 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,45 (br, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,30 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,11 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 5,90 (ddd, J = 17,0, 10,6, 6,2 Hz, 1H), 5,65 (q, J = 6,0 Hz, 1H), 5,49 – 5,29 (m, 2H), 4,31 – 4,08 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 1,41 ppm (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 176,51, 170,08, 156,49, 155,24, 154,88, 150,46 (d, J_{CF} = 243,2 Hz), 150,17, 140,90, 132,16, 128,18 (d, J_{CF} = 11,0 Hz), 127,86, 125,31 (d, J_{CF} = 4,8 Hz), 122,27, 119,64, 114,00, 109,56, 109,39, 108,76 (d, J_{CF} = 19,4 Hz), 72,18, 69,81, 39,34, 27,33, 21,19 ppm. HRMS (DART): m/z [M + H]⁺ calculada para C₂₅H₂₆BrFN₃O₅⁺, 546,1034; hallada, 546,1018.

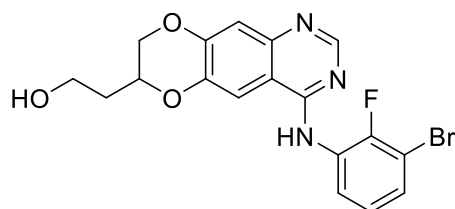
(±)-4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7-[(2-hidroxibut-3-en-1-il)oxi]quinazolin-6-ol ((±)-**8**).



Una mezcla de (±)-**7** en bruto (5508 mg, contaminada con el Ph₃PO restante de la última etapa) en MeOH (61 mL) con K₂CO₃ (4198 mg, 30,4 mmol), se agitó a 23 °C durante 1 h y se concentró. El residuo se suspendió en NH₄Cl semi-sat. ac. (1 L) y se extrajo con EtOAc (3 x 600 mL). Los orgánicos combinados se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron. FC (DCM/EtOAc 1:1 → 0:1) proporcionó el compuesto del título (±)-**8** (1154 mg, 45% en dos etapas) como un sólido blancuzco.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,46 (s, 1H), 9,40 (br, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,59 – 7,52 (m, 2H), 7,203 (s), 7,197 (td, J = 8,1, 1,1 Hz, 1H), 6,01 (ddd, J = 17,4, 10,7, 4,9 Hz, 1H), 5,42 (dt, J = 17,3, 1,9 Hz, 1H), 5,36 (br, 1H), 5,20 (dt, J = 10,6, 1,8 Hz, 1H), 4,49 (br, 1H), 4,20 (dd, J = 9,8, 3,8 Hz, 1H), 3,95 ppm (dd, J = 9,8, 7,5 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 156,77, 153,30 (d, J_{CF} = 244,9 Hz), 152,77, 152,31, 146,66, 146,11, 137,61, 129,75, 128,46 (d, J_{CF} = 13,0 Hz), 127,49, 125,38 (d, J_{CF} = 4,3 Hz), 115,58, 109,42, 108,50 (d, J_{CF} = 19,8 Hz), 107,68, 105,14, 72,56, 69,26 ppm. HRMS (DART): m/z [M + H]⁺ calculada para C₁₈H₁₆BrFN₃O₃⁺, 420,0354; hallada, 420,0340.

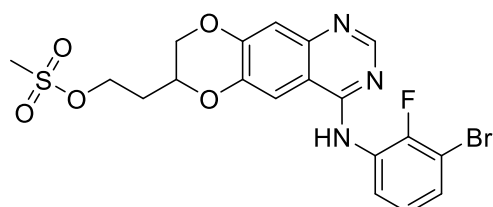
(±)-2-[4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-7-il]etan-1-ol ((±)-**9**).



Una mezcla de (±)-**JGK062** (480 mg, 1,19 mmol) en THF (4,8 mL) se trató con una solución de 9-BBN 0,5 M en THF (4,8 mL, 2,39 mmol) y la mezcla se agitó a 68 °C durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta 0 °C, se diluyó con THF (2,4 mL) y se trató con NaOH 3N (3 mL, 8,95 mmol) y H₂O₂ al 30% (474 µL, 8,95 mmol) y se agitó a 23 °C durante 6 h. La mezcla se concentró hasta alrededor de la mitad del volumen original de THF, se diluyó con agua (100 mL) y salmuera (40 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (70 mL), salmuera (70 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título (±)-**9** (912 mg) como una espuma amarilla, que se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,66 (s, 1H), 8,62 (ddd, J = 8,8, 7,4, 1,6 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,33 (br, 1H), 7,2 (ddd, J = 8,0, 6,5, 1,6 Hz, 1H), 7,16 (s, 1H), 7,09 (td, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,50 (dtd, J = 8,4, 6,4, 2,3 Hz, 1H), 4,43 (dd, J = 11,5, 2,3 Hz, 1H), 4,09 (dd, J = 11,5, 8,2 Hz, 1H), 4,01 – 3,91 (m, 2H), 1,95 ppm (td, J = 6,5, 5,3 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 155,84, 153,28, 150,08 (d, J_{CF} = 242,6 Hz), 149,42, 146,47, 144,20, 128,51 (d, J_{CF} = 10,2 Hz), 127,31, 125,30 (d, J_{CF} = 4,7 Hz), 121,69, 113,95, 110,50, 108,58 (d, J_{CF} = 19,2 Hz), 105,83, 71,33, 68,49, 58,23, 33,61 ppm. HRMS (ESI): m/z [M + H]⁺ calculada para C₁₈H₁₆BrFN₃O₃⁺, 420,0354; hallada, 420,0370.

Metanesulfonato de (±)-2-[4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-7-il]etilo ((±)-**10**).

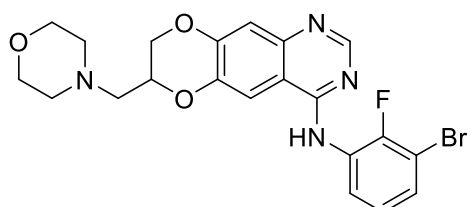


Una solución de (±)-**9** (912 mg) en THF (11,9 mL) se trató con Et₃N (931 mL, 6,68 mmol), se enfrió hasta 0 °C y se trató por goteo con MsCl (462 µL, 5,97 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min y entonces se agitó a 23 °C durante 21 h. La mezcla se enfrió hasta 0 °C, se trató por goteo con NaHCO₃ sat. ac. (120 mL) y se extrajo con DCM (3 x 120 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (100 mL), salmuera (100 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron. FC (DCM/EtOAc 9:1 → 4:6) proporcionó el compuesto del título (±)-**10** (112 mg, 19% en dos etapas) como una espuma friable blancuzca.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,68 (s, 1H), 8,60 (ddd, J = 8,6, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,44 (br, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,29 (ddd, J = 8,1, 6,5, 1,6 Hz, 1H), 7,11 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,60 – 4,48 (m, 3H), 4,44 (dd, J = 11,6, 2,4 Hz, 1H), 4,12 (dd, J = 11,6, 7,6 Hz, 1H), 3,08 (s, 3H), 2,24 – 2,10 ppm (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 156,03, 153,39, 150,31 (d, J_{CF} = 242,9 Hz), 149,11, 146,54, 143,60, 128,47 (d, J_{CF} = 10,5 Hz), 127,52, 125,32 (d, J_{CF} = 4,6 Hz), 122,02, 114,30, 110,68, 108,66 (d, J_{CF} = 19,2 Hz), 106,32, 69,78, 67,82, 65,05, 37,75, 30,90 ppm. HRMS

(ESI): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{19}H_{18}BrFN_3O_5S^+$, 498,0129; hallada, 498,0144.

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(morfolin-4-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina ((±)-**JGK063**).

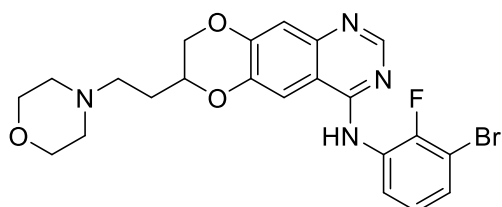


5

Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó el compuesto (±)-**JGK063** a partir de (±)-**6** (20 mg, 0,04 mmol) y morfolina (18 μ L, 0,21 mmol) en DMF (826 μ L). La PTLC (DCM/EtOAc 1:9) proporcionó (±)-**JGK063** (15 mg, 76%) como una espuma friable blancuzca.

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,67 (s, 1H), 8,63 (ddd, J = 8,6, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,37 (br, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,27 (ddd, J = 8,0, 6,3, 1,5 Hz, 1H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,50 – 4,41 (m, 2H), 4,21 – 4,12 (m, 1H), 3,75 (t, J = 4,7 Hz, 4H), 2,77 (dd, J = 13,4, 5,9 Hz, 1H), 2,69 – 2,54 ppm (m, 5H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 155,89, 153,36, 150,15 (d, J_{CF} = 242,5 Hz), 149,35, 146,66, 144,02, 128,60 (d, J_{CF} = 10,4 Hz), 127,27, 125,30 (d, J_{CF} = 4,6 Hz), 121,80, 114,29, 110,63, 108,58 (d, J_{CF} = 19,5 Hz), 106,06, 71,61, 67,18, 67,01, 58,94, 54,56 ppm. HRMS (ESI): m/z $[M - H]^-$ calculada para $C_{21}H_{19}BrFN_4O_3^-$, 473,0630; hallada, 473,0630. (±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[2-(morfolin-4-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina ((±)-**JGK064**).

15



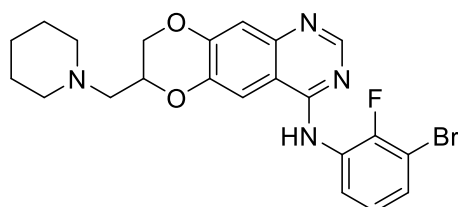
Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó el compuesto (±)-**JGK064** a partir de (±)-**10** (35 mg, 0,07 mmol) y morfolina (31 μ L, 0,35 mmol) en DMF (1,4 mL). PTLC (EtOAc, acetonitrilo al 0,5%, 1,5% de NH_4OH ac.) seguido de otra PTLC (EtOAc) proporcionó (±)-**JGK064** (25 mg, 73%) como una espuma friable blancuzca.

25

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,68 (s, 1H), 8,65 (ddd, J = 8,3, 7,4, 1,5 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,36 (br, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,30 – 7,25 (m, 1H), 7,11 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,44 (dd, J = 11,3, 2,3 Hz, 1H), 4,43 – 4,37 (m, 1H), 4,10 (dd, J = 11,3, 7,7 Hz, 1H), 3,73 (t, J = 4,7 Hz, 4H), 2,62 (ddt, J = 12,5, 8,4, 3,9 Hz, 2H), 2,57 – 2,42 (m, 4H), 2,00 – 1,82 ppm (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 155,86, 153,31, 150,13 (d, J_{CF} = 242,3 Hz), 149,40, 146,67, 144,33, 128,66 (d, J_{CF} = 10,4 Hz), 127,22, 125,33 (d, J_{CF} = 4,6 Hz), 121,75, 114,21, 110,63, 108,58 (d, J_{CF} = 19,2 Hz), 105,87, 72,20, 68,33, 67,06, 54,23, 53,86, 28,15 ppm. HRMS (ESI): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{22}H_{23}BrFN_4O_3^+$, 489,0932; hallada, 489,0935.

30

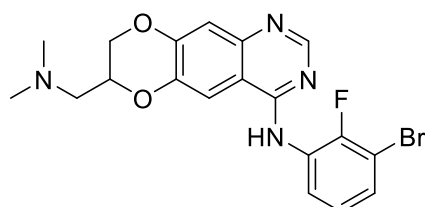
(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(piperidin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina ((±)-**JGK065**).



Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó el compuesto (±)-**JGK065** a partir de (±)-**6** (40 mg, 0,08 mmol) y piperidina (41 μ L, 0,41 mmol) en DMF (1,65 mL). La PTLC (EtOAc) proporcionó (±)-**JGK065** (24 mg, 61%) como una espuma friable blancuzca.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,66 (s, 1H), 8,63 (ddd, J = 8,7, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,369 (s, 1H), 7,368 (br, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,26 (ddd, J = 8,1, 6,5, 1,5 Hz, 1H), 7,09 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,46 (dd, J = 11,3, 2,3 Hz, 1H), 4,43 (ddd, J = 8,3, 5,8, 2,0 Hz, 1H), 4,12 (dd, J = 11,2, 7,5 Hz, 1H), 2,71 (dd, J = 13,3, 5,9 Hz, 1H), 2,58 (dd, J = 13,4, 6,2 Hz, 1H), 2,59 – 2,42 (m, 4H), 1,65 – 1,57 (m, 4H), 1,49 – 1,41 ppm (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 155,86, 153,26, 150,12 (d, J_{CF} = 242,6 Hz), 149,49, 146,62, 144,23, 128,65 (d, J_{CF} = 10,3 Hz), 127,18, 125,27 (d, J_{CF} = 4,5 Hz), 121,76, 114,16, 110,57, 108,56 (d, J_{CF} = 19,4 Hz), 106,00, 71,87, 67,46, 59,34, 55,59, 26,07, 24,20 ppm. HRMS (ESI): m/z [M + H]⁺ calculada para C₂₂H₂₃BrFN₄O₂⁺, 473,0983; hallada, 473,0991.

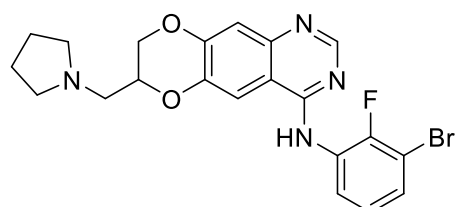
(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(dimetilamino)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina ((±)-**JGK066**).



Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó (±)-**JGK066** a partir de (±)-**6** (45 mg, 0,09 mmol) y una solución 2 M de Me₂NH en THF (232 μ L, 0,46 mmol) en DMF (1,85 mL). PTLC (EtOAc, acetonitrilo al 0,5%, 1,5% de NH₄OH ac.) proporcionó (±)-**JGK066** (39 mg, 97%) como una espuma friable blancuzca.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,680 (s, 1H), 8,675 (ddd, J = 8,2, 7,5, 1,5 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,37 (br, 1H), 7,27 (ddd, J = 8,0, 6,4, 1,5 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 4,46 – 4,41 (m, 1H), 4,45 (dd, J = 11,8, 2,3 Hz, 1H), 4,12 (dd, J = 11,9, 8,1 Hz, 1H), 2,73 (dd, J = 13,2, 7,1 Hz, 1H), 2,55 (dd, J = 13,1, 5,0 Hz, 1H), 2,38 ppm (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 155,89, 153,34, 150,07 (d, J_{CF} = 242,3 Hz), 149,38, 146,67, 144,06, 128,70 (d, J_{CF} = 10,4 Hz), 127,16, 125,29 (d, J_{CF} = 4,7 Hz), 121,65, 114,27, 110,67, 108,56 (d, J_{CF} = 19,4 Hz), 106,15, 71,70, 67,20, 59,78, 46,41 ppm. HRMS (ESI): m/z [M + H]⁺ calculada para C₁₉H₁₉BrFN₄O₂⁺, 433,0670; hallada, 433,0677.

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(pirrolidin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina ((±)-**JGK067**).

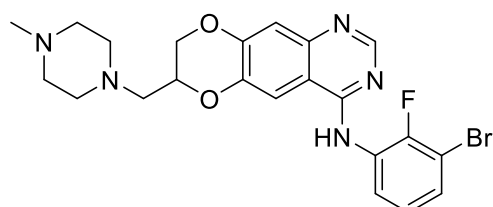


Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó el compuesto (±)-**JGK067** a partir de (±)-

6 (35 mg, 0,07 mmol) y pirrolidina (30 μ L, 0,36 mmol) en DMF (1,45 mL). PTLC (EtOAc, *i*PrOH al 1,5%, 1,5% de NH_4OH ac.) proporcionó ($\pm$)-**JGK067** (31 mg, 93%) como una espuma friable blancuzca.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,68 (s, 1H), 8,67 (ddd, J = 8,7, 7,5, 1,6 Hz, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,36 (br, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,27 (ddd, J = 8,0, 6,4, 1,5 Hz, 2H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,49 – 4,42 (m, 1H), 4,48 (dd, J = 11,6, 2,0 Hz, 1H), 4,15 (dd, J = 11,7, 8,0 Hz, 1H), 2,88 (dd, J = 12,9, 6,5 Hz, 1H), 2,80 (dd, J = 12,6, 5,5 Hz, 1H), 2,72 – 2,60 (m, 4H), 1,90 – 1,79 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 155,87, 153,32, 150,09 (d, J_{CF} = 242,6 Hz), 149,45, 146,68, 144,18, 128,71 (d, J_{CF} = 10,3 Hz), 127,15, 125,30 (d, J_{CF} = 4,7 Hz), 121,67, 114,26, 110,65, 108,56 (d, J_{CF} = 19,4 Hz), 106,06, 72,73, 67,35, 56,57, 55,15, 23,75 ppm. HRMS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$, 459,0826; hallada, 459,0845.

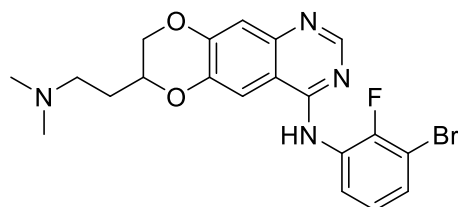
($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (($\pm$)-**JGK068**).



15 Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó el compuesto ($\pm$)-**JGK068** a partir de ($\pm$)-**6** (35 mg, 0,07 mmol) y 1-metilpiperazina (40 μ L, 0,36 mmol) en DMF (1,45 mL). PTLC (EtOAc/*i*PrOH 85:15, 1,5% de NH_4OH ac.) proporcionó ($\pm$)-**JGK068** (29 mg, 82%) como una espuma friable blancuzca.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,68 (s, 1H), 8,64 (ddd, J = 8,3, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,36 (br d, J = 3,8 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,27 (ddd, J = 8,0, 6,5, 1,6 Hz, 1H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,48 – 4,41 (m, 2H), 4,15 (dd, J = 11,5, 8,6 Hz, 1H), 2,78 (dd, J = 13,4, 6,0 Hz, 1H), 2,661 (dd, J = 13,4, 5,8 Hz, 1H), 2,656 (br, 4H), 2,51 (br, 4H), 2,32 ppm (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 155,89, 153,35, 150,15 (d, J_{CF} = 242,6 Hz), 149,40, 146,69, 144,11, 128,64 (d, J_{CF} = 10,3 Hz), 127,24, 125,30 (d, J_{CF} = 4,7 Hz), 121,78, 114,27, 110,63, 108,59 (d, J_{CF} = 19,2 Hz), 106,07, 71,80, 67,27, 58,43, 55,10, 53,96, 46,06 ppm. HRMS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrFN}_5\text{O}_2^+$, 488,1092; hallada, 488,1109.

($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[2-(dimetilamino)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (($\pm$)-**JGK069**).

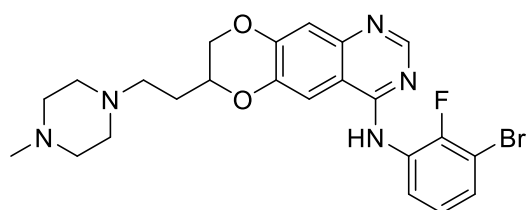


30 Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó ($\pm$)-**JGK069** a partir de ($\pm$)-**10** (32 mg, 0,06 mmol) y una solución 2 M de Me_2NH en THF (161 μ L, 0,32 mmol) en DMF (1,3 mL). PTLC (EtOAc, *i*PrOH al 5%, 1,5% de NH_4OH ac.) proporcionó ($\pm$)-**JGK069** (19 mg, 66%) como una espuma friable blancuzca.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,67 (s, 1H), 8,63 (ddd, J = 8,7, 7,4, 1,6 Hz, 1H), 7,373 (br, 1H), 7,371 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,28 – 7,24 (m, 1H), 7,10 (td, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,42 (dd, J = 11,4,

2,3 Hz, 1H), 4,38 (tdd, $J = 7,7, 5,1, 2,3$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 11,3, 7,8$ Hz, 1H), 2,56 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,29 (s, 6H), 1,93 (dq, $J = 14,2, 7,4$ Hz, 1H), 1,84 ppm (dtd, $J = 14,2, 7,5, 5,1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 155,86, 153,26, 150,14$ (d, $J_{\text{CF}} = 242,4$ Hz), 149,42, 146,65, 144,36, 128,67 (d, $J_{\text{CF}} = 10,5$ Hz), 127,18, 125,30 (d, $J_{\text{CF}} = 4,7$ Hz), 121,77, 114,14, 110,60, 108,56 (d, $J_{\text{CF}} = 19,2$ Hz), 105,88, 72,19, 68,34, 55,06, 45,58, 29,16 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$, 447,0826; hallada, 447,0820.

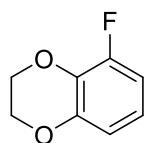
($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (($\pm$)-**JGK070**).



10 Siguiendo el procedimiento general **GP-1**, se preparó el compuesto ($\pm$)-**JGK070** a partir de ($\pm$)-**10** (32 mg, 0,06 mmol) y 1-metilpiperazina (36 μL , 0,32 mmol) en DMF (1,3 mL). PTLC (EtOAc/*i*PrOH 8:2, 1,5% de NH_4OH ac.) proporcionó ($\pm$)-**JGK070** (21 mg, 65%) como una espuma friable blancuzca.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,66$ (s, 1H), 8,62 (ddd, $J = 8,5, 7,3, 1,5$ Hz, 1H), 7,373 (br, 1H), 7,367 (s, 1H), 7,29 – 7,24 (m, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,09 (td, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H), 4,43 (dd, $J = 11,4, 2,3$ Hz, 1H), 4,37 (tdd, $J = 7,7, 5,4, 2,3$ Hz, 1H), 4,08 (dd, $J = 11,4, 7,9$ Hz, 1H), 2,68 – 2,54 (m, 2H), 2,50 (br, 8H), 2,30 (s, 3H), 1,94 (dtd, $J = 13,6, 7,5, 6,0$ Hz, 1H), 1,86 ppm (dtd, $J = 14,2, 7,3, 5,3$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 155,86, 153,27, 150,16$ (d, $J_{\text{CF}} = 242,5$ Hz), 149,41, 146,64, 144,37, 128,64 (d, $J_{\text{CF}} = 10,3$ Hz), 127,22, 125,28 (d, $J_{\text{CF}} = 4,6$ Hz), 121,81, 114,13, 110,60, 108,57 (d, $J_{\text{CF}} = 19,4$ Hz), 105,88, 72,38, 68,36, 55,20, 53,77, 53,25, 46,11, 28,50 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BrFN}_5\text{O}_2^+$, 502,1248; hallada, 502,1261.

5-fluoro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina (**11**).

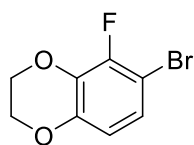


25 Una mezcla de 3-fluorobenceno-1,2-diol (7233 mg, 56,5 mmol) en DMF (113 mL) se trató con K_2CO_3 (19514 mg, 141 mmol), se agitó durante 10 min a 23°C y se trató con 1-bromo-2-cloroetano (9,4 mL, 113 mmol). La mezcla se agitó a 23°C durante 1 h y entonces se agitó a 95°C durante 16 h. Se enfrió la mezcla a 23°C , se diluyó con agua (150 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 150 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (90 mL), salmuera (90 mL), se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron. La FC (hexanos/EtOAc 30:1 $\rightarrow$ 10:1) proporcionó el compuesto del título **11** (7973 mg, 92%) como un aceite transparente e incoloro.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6,78 - 6,63$ (m, 3H), 4,34 – 4,26 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 152,05$ (d, $J_{\text{CF}} = 244,3$ Hz), 145,27 (d, $J_{\text{CF}} = 3,8$ Hz), 132,78 (d, $J_{\text{CF}} = 13,9$ Hz), 120,02 (d, $J_{\text{CF}} = 8,9$ Hz), 112,74 (d, $J_{\text{CF}} = 3,1$ Hz), 108,52 (d, $J_{\text{CF}} = 18,1$ Hz), 64,50, 64,45 ppm.

35 HRMS (DART): m/z $[\text{M}]^{++}$ calculada para $\text{C}_8\text{H}_7\text{FO}_2^{++}$, 154,0425; hallada, 154,0420.

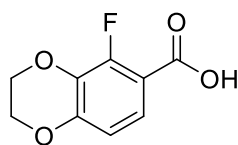
6-bromo-5-fluoro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxina (**12**).



Se trató una solución de **11** (7812 mg, 50,7 mmol) en MeOH (101 mL) con NBS (9022 mg, 50,7 mmol) y se calentó a 70 °C durante 30 min. La mezcla se enfrió hasta 23 °C y se concentró. El residuo se disolvió en DCM (700 mL), se lavó con agua (300 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. FC (hexanos/EtOAc 30:1 → 20:1) seguido de secado bajo HV a 100 ° C para eliminar cualquier material de partida restante, proporcionó el compuesto del título **12** (8807 mg, 75%, que contenía alrededor de 15% del regioisómero) como un aceite transparente e incoloro, que se solidificó en el congelador para proporcionar un sólido blancuzco.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6,96 (dd, *J* = 9,0, 7,0 Hz, 1H), 6,59 (dd, *J* = 9,0, 2,0 Hz, 1H), 4,35 – 4,24 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 148,87 (d, *J*_{CF} = 245,1 Hz), 144,53 (d, *J*_{CF} = 3,5 Hz), 133,81 (d, *J*_{CF} = 14,6 Hz), 123,31, 113,39 (d, *J*_{CF} = 3,6 Hz), 109,17 (d, *J*_{CF} = 19,3 Hz), 64,51, 64,34 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M]⁺ calculada para C₈H₆BrFO₂⁺, 231,9530; hallada, 231,9525.

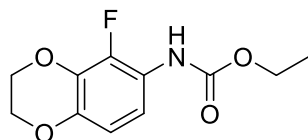
Ácido 5-fluoro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-carboxílico (**13**).



Una mezcla de **12** (7,0 g, 30,0 mmol) en THF (108 mL) se enfrió hasta -78 °C y se trató por goteo con una solución de 2,5 M de *n*BuLi en hexanos (12,02 mL, 30,0 mmol) durante 10 min. La mezcla se agitó a -78 °C durante 30 min y luego se transfirió mediante una cánula a hielo seco triturado (se enjuagó la cánula con 10 mL de THF). La mezcla se dejó calentar hasta 23 °C y se concentró. Se añadieron agua (200 mL) y NaOH 1 M (50 mL) al residuo y la fase acuosa se extrajo con Et₂O (3 x 60 mL). La fase ac. se acidificó con HCl 6 M (15 mL) y se extrajo con DCM (3 x 150 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (150 mL), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron. La FC (hexanos/EtOAc 7:3 → 3:7) proporcionó el compuesto del título **13** (3591 mg, 60%) como un sólido blanco.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,90 (br, 1H), 7,33 (dd, *J* = 8,9, 7,7 Hz, 1H), 6,78 (dd, *J* = 8,9, 1,7 Hz, 1H), 4,39 – 4,29 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164,65 (d, *J*_{CF} = 3,0 Hz), 151,21 (d, *J*_{CF} = 257,5 Hz), 148,50 (d, *J*_{CF} = 4,4 Hz), 132,68 (d, *J*_{CF} = 13,6 Hz), 122,44 (d, *J*_{CF} = 1,4 Hz), 112,12 (d, *J*_{CF} = 3,4 Hz), 111,97 (d, *J*_{CF} = 7,3 Hz), 64,42, 63,91 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M – H][–] calculada para C₉H₆FO₄[–], 197,0256; hallada, 197,0250.

(5-fluoro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)carbamato de etilo (**14**).

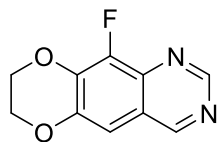


Se trató una mezcla de **13** (650 mg, 3,28 mmol) en tolueno (13,1 mL) con Et₃N (1,4 mL, 9,84 mmol), y a 10 °C con DPPA (780 μL, 3,62 mmol). La mezcla se agitó a 23 °C durante 30 min, entonces se agitó a 85 °C durante 1,5 h. La mezcla se enfrió hasta 23 °C, se trató con EtOH (5 mL), se agitó durante 1,5 h a 23 °C y se concentró. El residuo se disolvió en Et₂O (150 mL), se

lavó con NaHCO₃ (40 mL), agua (40 mL), salmuera (40 mL), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. La FC (hexanos/DCM 7:3 → 1:9) proporcionó el compuesto del título **14** (512 mg, 65%) como un sólido blanco.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,42 (br, 1H), 6,64 (dd, *J* = 9,2, 2,2 Hz, 1H), 6,56 (br, 1H), 4,32 – 4,24 (m, 4H), 4,22 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,31 ppm (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 153,80, 142,61 (d, *J*_{CF} = 246,0 Hz), 140,82, 132,66 (d, *J*_{CF} = 12,4 Hz), 120,36 (d, *J*_{CF} = 6,9 Hz), 112,36, 111,81 (d, *J*_{CF} = 3,7 Hz), 64,72, 64,29, 61,61, 14,66 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₁H₁₃FNO₄⁺, 242,0823; hallada, 242,0816.

10-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolina (15).

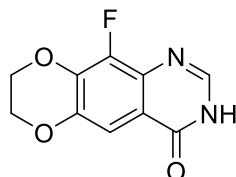


Se irradió una mezcla de **14** (450 mg, 1,87 mmol) y HMTA (263 mg, 1,87 mmol) en TFA (5,7 mL) en el microondas a 110 °C durante 10 min. La mezcla se enfrió hasta 23 °C, se diluyó con agua (60 mL), se trató con NaOH 6 M (12 mL) y se extrajo con DCM (3 x 60 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (50 mL), salmuera (50 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron para proporcionar un aceite amarillo gomoso.

Se trató una mezcla del aceite en KOH al 10% en dioxano/agua 1:1 (15,5 mL) con [K₃Fe(CN)₆] (614 mg, 1,87 mmol) y se irradió en el microondas a 100 °C durante 10 minutos. Este procedimiento se repitió un total de cuatro veces (4 ciclos de adición de 1 equiv. de ferricianuro de potasio seguido de irradiación con microondas). La mezcla resultante se diluyó con agua (160 mL) y se extrajo con DCM (3 x 120 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (100 mL), salmuera (100 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título **15** (330 mg, 86%) como un sólido amarillo, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9,21 (br, 1H), 9,19 (s, 1H), 7,18 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 4,53 – 4,41 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 158,06 (d, *J*_{CF} = 2,9 Hz), 153,81 (d, *J*_{CF} = 1,8 Hz), 145,76 (d, *J*_{CF} = 2,9 Hz), 144,40 (d, *J*_{CF} = 256,1 Hz), 138,56 (d, *J*_{CF} = 11,0 Hz), 136,73 (d, *J*_{CF} = 10,1 Hz), 119,81 (d, *J*_{CF} = 2,7 Hz), 106,55 (d, *J*_{CF} = 4,3 Hz), 64,78, 64,34 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₀H₈FN₂O₂⁺, 207,0564; hallada, 207,0563.

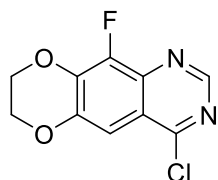
10-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4(3H)-ona (16).



Una solución de **15** (306 mg, 1,48 mmol) en AcOH (1 mL) se trató por goteo con una solución 0,833 M de CAN en agua (7,12 mL, 5,94 mmol) y se agitó a 23 °C durante 15 min. El precipitado blanco se recogió por filtración y se lavó con agua (2 x 2 mL), acetonitrilo (2 x 2 mL), DCM (2 mL) y Et₂O (2 mL) para proporcionar un primer lote del compuesto del título. El filtrado ac. se neutralizó a pH ~7 con 1 M de NaOH, y el precipitado blanco se recogió como antes mediante filtración, seguido de lavados para producir un segundo lote del compuesto del título **16** (81 mg, 25%) como un sólido blanco.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 12,19 (br, 1H), 7,98 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 4,52 – 4,28 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 159,31, 144,58 (d, J_{CF} = 251,8 Hz), 144,28, 143,80 (d, J_{CF} = 3,4 Hz), 137,86 (d, J_{CF} = 11,1 Hz), 132,94 (d, J_{CF} = 8,9 Hz), 115,75, 106,62 (d, J_{CF} = 3,7 Hz), 64,57, 64,02 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FN}_2\text{O}_3^+$, 223,0513; hallada, 223,0503.

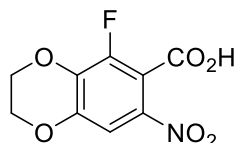
4-cloro-10-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolina (**17**).



Se trató una suspensión agitada de **16** (92 mg, 0,41 mmol) en tolueno (1,2 mL) con DIPEA (220 μL , 1,26 mmol), seguido de la adición por goteo de POCl_3 (103 μL , 1,12 mmol) a 10 °C. La mezcla se agitó a 23 °C durante 1 h, entonces se agitó a 90 °C durante 5 h. El residuo se trató con NaHCO_3 sat. ac. (10 mL) a 0 °C durante 5 min, se diluyó la mezcla con agua (5 mL) y se extrajo con DCM (3 x 7 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con NaHCO_3 semi-sat. ac. (7 mL), salmuera (7 mL), se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título **17** (51 mg, 51%) como un sólido marrón claro, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8,90 (s, 1H), 7,51 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 4,55 – 4,43 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 160,48 (d, J_{CF} = 4,3 Hz), 152,31, 146,29 (d, J_{CF} = 3,3 Hz), 144,63 (d, J_{CF} = 256,2 Hz), 138,95 (d, J_{CF} = 11,3 Hz), 137,68 (d, J_{CF} = 10,2 Hz), 118,56 (d, J_{CF} = 2,4 Hz), 105,82 (d, J_{CF} = 4,2 Hz), 64,81, 64,41 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClFN}_2\text{O}_2^+$, 241,0175; hallada, 241,0174.

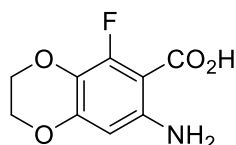
Ácido 5-fluoro-7-nitro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-carboxílico (**18**).



Se trató por goteo una mezcla de **13** (1500 mg, 7,57 mmol) en AcOH (7,5 mL) con H_2SO_4 (2,02 mL) a 10 °C. La mezcla se agitó vigorosamente se trató por goteo con HNO_3 al 65% (2,6 mL) a 0 °C durante 10 min. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 30 min y luego a 23 °C durante 16 h. La mezcla se vertió en agua helada (40 mL) y el precipitado blanco se recogió por filtración (lavados con agua fría, 40 mL) y se secó en un desecador para proporcionar el compuesto del título **18** (1280 mg, 70%) como un sólido blanco.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 14,09 (br, 1H), 7,62 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 4,52 – 4,40 ppm (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 162,71, 147,16 (d, J_{CF} = 248,7 Hz), 144,72 (d, J_{CF} = 5,1 Hz), 138,15 (d, J_{CF} = 13,7 Hz), 137,10 (d, J_{CF} = 6,6 Hz), 113,44 (d, J_{CF} = 20,3 Hz), 109,52 (d, J_{CF} = 2,3 Hz), 64,97, 64,48 ppm. HRMS (DART): m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calculada para $\text{C}_9\text{H}_5\text{FNO}_6^-$, 242,0106; hallada, 242,0124.

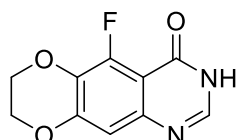
Ácido 7-amino-5-fluoro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-carboxílico (**19**).



Una mezcla de **18** (500 mg, 2,06 mmol) y Pd/C al 5% (223 mg, 0,10 mmol) en MeOH (21 mL) se agitó bajo una atmósfera de H₂ a 23 °C durante 13,5 h. La mezcla se filtró a través de Celite (lavados con EtOH) y se evaporó para proporcionar el compuesto del título **19** (418 mg, 95%) como un sólido gris, que no parecía ser muy estable.

- 5 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,35 (br, 2H), 6,04 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 4,29 – 4,24 (m, 2H), 4,19 – 4,14 ppm (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167,36 (d, *J*_{CF} = 2,9 Hz), 151,36 (d, *J*_{CF} = 252,0 Hz), 148,86 (d, *J*_{CF} = 7,0 Hz), 145,81 (d, *J*_{CF} = 5,7 Hz), 122,88 (d, *J*_{CF} = 15,4 Hz), 97,19 (d, *J*_{CF} = 2,9 Hz), 95,37 (d, *J*_{CF} = 10,9 Hz), 64,95, 63,58 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₉H₉FNO₄⁺, 214,0510; hallada, 214,0508.

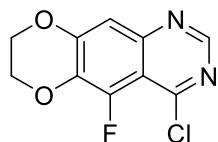
- 10 *5-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4(3H)-ona (20)*.



Se agitó una mezcla de **19** (417 mg, 1,96 mmol) en formamida (2,3 mL, 58,7 mmol) a 120-125 °C durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se trató con agua (4 mL), se agitó durante 30 min, se diluyó con agua (4 mL) y se filtró. El residuo se lavó con agua fría (3 x 5 mL) y se secó sobre Drierite bajo HV para proporcionar el compuesto del título **20** (249 mg, 57%) como un sólido blancuzco.

- 15 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,00 (br, 1H), 7,90 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 4,45 – 4,35 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 157,64 (d, *J*_{CF} = 3,0 Hz), 149,70 (d, *J*_{CF} = 6,0 Hz), 148,45 (d, *J*_{CF} = 261,3 Hz), 144,60, 142,99, 131,47 (d, *J*_{CF} = 12,7 Hz), 108,76 (d, *J*_{CF} = 3,5 Hz), 106,38 (d, *J*_{CF} = 3,8 Hz), 64,69, 63,98 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₀H₈FN₂O₃⁺, 223,0513; hallada, 223,0510.

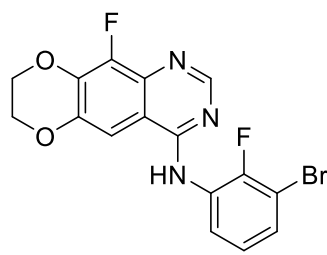
4-cloro-5-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolina (21).



Se trató una suspensión agitada de **20** (90 mg, 0,41 mmol) en tolueno (1,2 mL) con DIPEA (215 μL, 1,24 mmol), seguido de la adición por goteo de POCl₃ (100 μL, 1,09 mmol) a 10 °C. La mezcla se agitó a 23 °C durante 1 h, entonces se agitó a 88 °C durante 5 h. El residuo se trató con NaHCO₃ sat. ac. (10 mL) a 0 °C, se diluyó la mezcla con agua (5 mL) y se extrajo con DCM (3 x 7 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con NaHCO₃ semi-sat. ac. (7 mL), salmuera (7 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título **21** (96 mg, 99%) como un sólido anaranjado claro, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 25 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,83 (s, 1H), 7,35 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 4,51 – 4,45 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 156,76 (d, *J*_{CF} = 4,5 Hz), 152,70 (d, *J*_{CF} = 2,3 Hz), 151,66 (d, *J*_{CF} = 4,9 Hz), 146,08, 144,51 (d, *J*_{CF} = 261,8 Hz), 134,04 (d, *J*_{CF} = 14,0 Hz), 110,85 (d, *J*_{CF} = 7,7 Hz), 109,43 (d, *J*_{CF} = 4,0 Hz), 64,89, 64,37 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₀H₇ClFN₂O₂⁺, 241,0175; hallada, 241,0176.

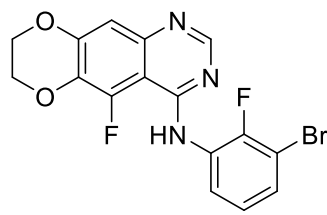
N-(3-bromo-2-fluorofenil)-10-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-g]quinazolin-4-amina (JGK071).



Siguiendo el procedimiento general **GP-2**, se preparó el compuesto **JGK071** a partir de cloroquinazolina **17** (35 mg, 0,15 mmol) y 3-bromo-2-fluoroanilina. FC (DCM/EtOAc 1:0 → 8:2) proporcionó **JGK071** (44 mg, 77%) como un sólido blanco.

5 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,76 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,80 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,62 (ddd, *J* = 8,0, 6,3, 1,6 Hz, 1H), 7,54 (ddd, *J* = 8,5, 7,1, 1,6 Hz, 1H), 7,22 (td, *J* = 8,0, 1,2 Hz, 1H), 4,53 – 4,40 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 156,93 (d, *J*_{CF} = 3,7 Hz), 153,44 (d, *J*_{CF} = 247,5 Hz), 153,12, 144,04 (d, *J*_{CF} = 250,0 Hz), 143,97 (d, *J*_{CF} = 3,2 Hz), 137,04 (d, *J*_{CF} = 10,9 Hz), 135,62 (d, *J*_{CF} = 9,9 Hz), 130,48, 127,89, 127,62 (d, *J*_{CF} = 13,1 Hz), 125,51 (d, *J*_{CF} = 4,5 Hz), 108,58 (d, *J*_{CF} = 23,4 Hz), 108,51, 103,25 (d, *J*_{CF} = 3,9 Hz), 64,63, 64,21 ppm. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₆H₁₁BrF₂N₃O₂⁺, 393,9997; hallada, 393,9999.

N-(3-bromo-2-fluorofenil)-5-fluoro-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK072**).



15 Siguiendo el procedimiento general **GP-2**, se preparó el compuesto **JGK072** a partir de cloroquinazolina **21** (35 mg, 0,15 mmol) y 3-bromo-2-fluoroanilina. FC (DCM/EtOAc 1:0 → 8:2) proporcionó **JGK072** (47 mg, 82%) como un sólido blanco.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,67 (ddd, *J* = 8,6, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,52 (dd, *J* = 19,6, 2,2 Hz, 1H), 7,29 (ddd, *J* = 8,1, 6,4, 1,5 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,10 (td, *J* = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,48 – 4,42 ppm (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 155,27 (d, *J*_{CF} = 5,2 Hz), 153,90, 150,34 (d, *J*_{CF} = 243,9 Hz), 149,93 (d, *J*_{CF} = 6,2 Hz), 145,75 (d, *J*_{CF} = 250,3 Hz), 144,78, 131,96 (d, *J*_{CF} = 15,6 Hz), 128,43 (d, *J*_{CF} = 10,4 Hz), 127,71, 125,20 (d, *J*_{CF} = 4,7 Hz), 122,48, 109,69 (d, *J*_{CF} = 3,3 Hz), 108,63 (d, *J*_{CF} = 19,2 Hz), 101,42 (d, *J*_{CF} = 7,2 Hz), 64,84, 64,48 ppm.

25 HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₆H₁₁BrF₂N₃O₂⁺, 393,9997; hallada, 393,9996.

Ejemplo 17: Penetración cerebral de compuestos ilustrativos de la descripción

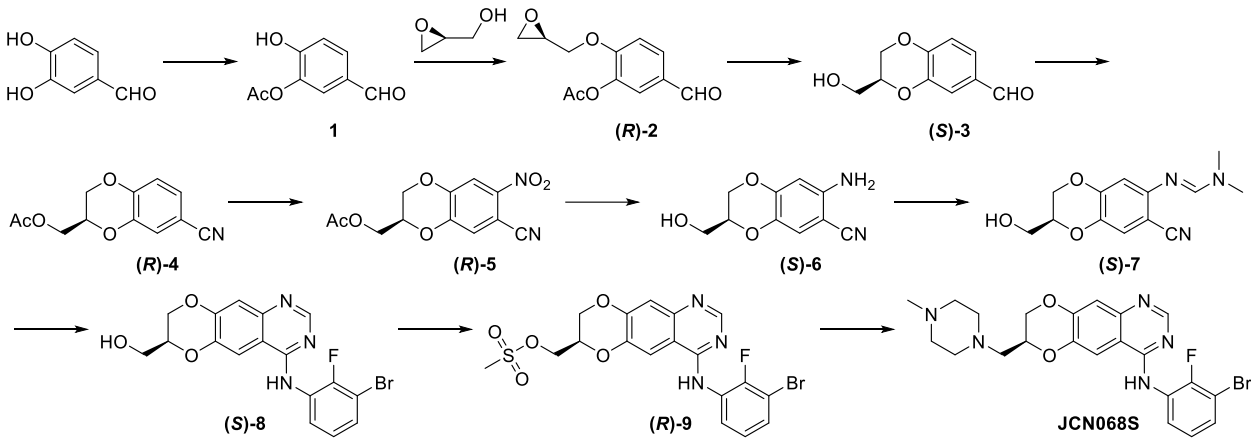
En la tabla 5 se describen proporciones de porcentajes de cerebro con respecto a plasma y proporciones sin unir en cerebro con respecto a plasma de los fármacos indicados en ratones no portadores de tumores

30 Tabla 5: Penetración cerebral de compuestos ilustrativos de la descripción

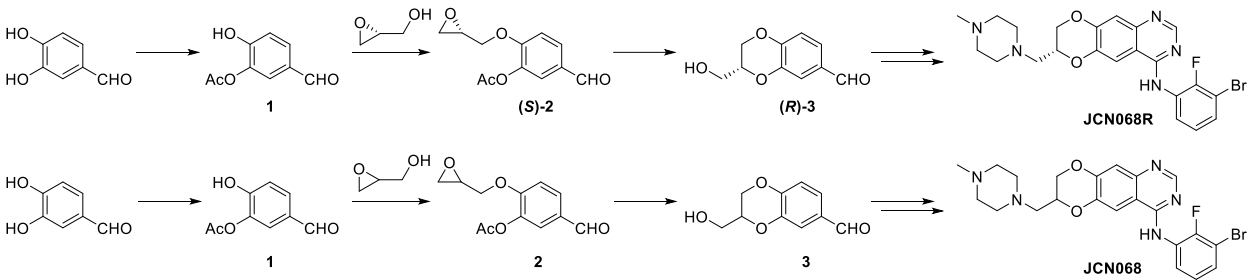
Compuesto	Penetración cerebral (% de plasma)	Kpuu (promedio)
Erlotinib	8,50	0,051
JGK005	64,8	0,491

JGK038	84,3	0,575
JGK028	106,2	1,037
JGK010	106,4	1,045
JGK037	212,1	1,301
JGK042	167,6	1,033
JGK063	72,5	0,341
JGK066	274,3	1,175
JGK068	354,5	1,184
JGK068S	378,3	1,181
JGK074	166,2	n. d.
JGK083S	231,3	0,798

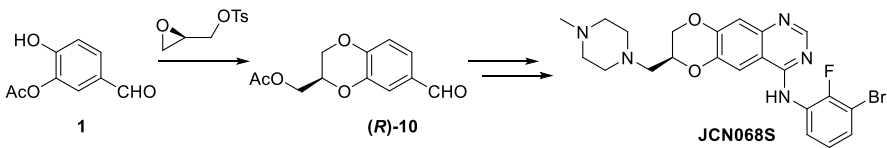
Ejemplo 18: Preparación de compuestos ilustrativos de la serie JGK



Esquema 1. Síntesis de JGK068S.



5 **Esquema 2.** La preparación del enantiómero(*R*)-enantiómero **JGK068R** o de mezclas racémicas (**JGK068**) sigue la misma ruta que se muestra en el esquema 1, pero emplea (*R*)- o glicidol racémico, respectivamente.



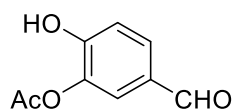
10 **Esquema 3.** Síntesis de carbaldeído de benzodioxano (*R*)-10 en una etapa a partir de benzaldehído **1** con tosilato de glicidilo quiral. Esta ruta evita la reacción de Mitsunobu en el esquema 1 (preparación de **2** a partir de **1**). El compuesto (*R*)-10 puede usarse en la ruta mostrada en el esquema 1 para la preparación de **JGK068S**.

Información química general

15 Todos los químicos, reactivos y solventes se adquirieron de fuentes comerciales cuando estuvieran disponibles y se utilizaron tal cual se recibieron. Cuando fue necesario, los reactivos

y solventes se purificaron y secaron mediante métodos estándar. Las reacciones sensibles al aire y a la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera inerte de argón en material de vidrio secado al horno. Las reacciones irradiadas con microondas se llevaron a cabo en un sintetizador de microondas CEM Discover de reactor de modo simple. Las reacciones a temperatura ambiente (T.A.) se llevaron a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Todas las reacciones se controlaron mediante cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ precubiertas, donde las manchas se visualizaron mediante luz UV (λ = 254, 365 nm) o mediante el uso de una solución de KMnO₄ alcalina. La cromatografía en columna ultrarrápida (FC) se llevó a cabo en SiO₂ 60 (tamaño de partícula 0,040–0,063 mm, 230–400 mesh). La cromatografía en capa fina preparativa (PTLC) se llevó a cabo con placas de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm, 210–270 mm) o placas de gel de sílice GF TLC Analtech Silica (20 x 20 cm, 1000 mm). La concentración a presión reducida (al vacío) se realizó mediante evaporación rotatoria a 23–50 °C. Los compuestos purificados se secaron adicionalmente al alto vacío o en un desecador. Los rendimientos corresponden a compuestos purificados y no se optimizaron adicionalmente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (que funcionan a 300, 400 o 500 MHz). Los espectros de NMR de carbono (¹³C RMN) se registraron en espectrómetros Bruker (ya sea a 400 ó 500 MHz). Los desplazamientos químicos de NMR (δ ppm) se referenciaron a las señales de solvente residual. Los datos de ¹H NMR se informan como sigue: desplazamiento químico en ppm; multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, quint = quinteto, m = multiplete/patrón complejo, td = triplete de dobletes, ddd = doblete de dobletes, br = señal amplia); constantes de acoplamiento (J) en Hz, integración. Los datos para espectros de ¹³C NMR se informan en términos de desplazamiento químico y de constantes de acoplamiento aplicables. Los datos de espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrometro de masas Thermo Fisher Scientific Exactive Plus con fuente IonSense ID-CUBE DART o en un espectrometro de masas Waters LCT Premier con ACQUITY UPLC con automuestreador.

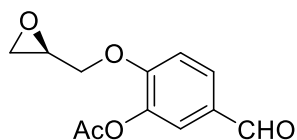
Acetato de 5-formil-2-hidroxifenilo (1).



Una mezcla de 3,4-dihidroxibenzaldehído (100 g, 0,724 mol) en THF (965 mL) se enfrió hasta 0 °C y se trató con 10% de NaOH (724 mL, 1,81 mol) durante 4–5 min. Después de que la mezcla de reacción se agitara a 0 °C durante 15 min, se añadió por goteo anhídrido acético (Ac₂O, 82,1 mL, 0,869 mol) durante 20 min. La mezcla se agitó durante 30 min a la misma temperatura y luego se vertió en una mezcla de EtOAc (1,25 L) y HCl 2M (1,13 L) a 0 °C. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (4 x 250 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (2 x 500 mL), salmuera (500 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron. El residuo se trató con una pequeña cantidad de *n*-heptano y se evaporó (3x). La recristalización en EtOAc (275 mL; los cristales se lavaron con Et₂O) proporcionó una primera cosecha del compuesto del título **1** (66,96 g, 51%) como cristales de color marrón claro. La recristalización de las aguas madres en EtOAc dio una segunda cosecha

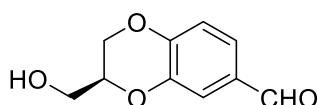
del compuesto del título **1** (29,436 g, 23%) como un sólido de color marrón claro. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9,85 (s, 1H), 7,73 – 7,65 (m, 2H), 7,11 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,34 (br, 1H), 2,39 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 190,40, 168,99, 152,96, 138,81, 130,24, 129,72, 124,13, 117,87, 21,09. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4^+$, 181,0495; hallada, 181,0488.

Acetato de 5-formil-2-[(2*R*)-oxiran-2-il]metoxifenilo ((*R*)-**2**).



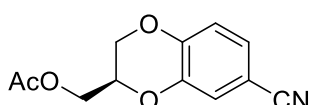
Una mezcla de **1** (32,5 g, 0,18 mol) y trifenilfosfina (PPh_3 , 70,976 g, 0,27 mol) en THF (905 mL) se trató con (*S*)-glicidol (17,95 mL, 0,27 mol), se enfrió hasta 0 °C y se trató por goteo con azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 56,8 mL, 0,289 mmol) durante 30 min. La mezcla se agitó durante 10 min más a 0 °C, después de lo cual se retiró el baño de enfriamiento y se continuó la agitación a 23 °C durante 15,5 h. Se evaporaron todos los volátiles y se usó (*R*)-**2** en bruto, obtenido como un aceite marrón, sin purificación adicional en la siguiente etapa.

(3*S*)-3-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-carbaldehído ((*S*)-**3**).



Se trató una mezcla de (*R*)-**2** en bruto en MeOH (1,564 L) con K_2CO_3 (49,87 g, 0,36 mol) y se agitó a 23 °C durante 18,5 h, y luego se evaporó el solvente. El residuo se suspendió en NH_4Cl semi-sat. ac. (750 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 500 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (250 mL), salmuera (250 mL), se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron. El material en bruto se purificó mediante varias rondas de cromatografía ultrarrápida (hexanos/EtOAc 9:1 $\rightarrow$ 1:1) así como mediante precipitación en hexanos/ Et_2O 1:1 (para eliminar el óxido de trifenilfosfina Ph_3PO), para proporcionar el compuesto del título (*S*)-**3** (17,322 g, 49% en dos etapas) como un sólido blanco. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 9,81 (s, 1H), 7,43 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,41 (dd, J = 8,1, 1,9 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 4,39 (dd, J = 11,4, 2,3 Hz, 1H), 4,31 – 4,25 (m, 1H), 4,20 (dd, J = 11,3, 7,9 Hz, 1H), 3,95 (dd, J = 12,1, 4,3 Hz, 1H), 3,87 (dd, J = 12,1, 4,9 Hz, 1H), 2,18 (br, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 190,79, 148,76, 143,46, 130,79, 124,46, 118,33, 117,70, 73,31, 65,61, 61,54. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4^+$, 195,0652; hallada, 195,0650.

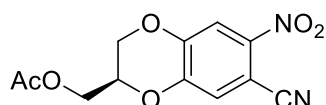
Acetato de [(2*R*)-7-ciano-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il]metilo ((*R*)-**4**).



Una mezcla de (*S*)-**3** (17,322 g, 0,089 mol) en AcOH (189 mL) se trató con KOAc (22,944 g, 0,234 mol), se agitó a 23 °C durante 10 min y luego se trató con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (16,233 g, 0,234 mol). La mezcla resultante se agitó a 120 – 125 °C durante 18,5 h. Se enfrió la mezcla a 23 °C, se vertió en agua (1 L) y se extrajo con EtOAc (4 x 250 mL). Los extractos orgánicos combinados se trataron con NaOH 3,5 M (400 mL) y NaHCO_3 sat. ac. (100 mL) para obtener un pH final de

~8 y la emulsión se agitó a 23 °C durante 1 h. La capa orgánica se separó y se lavó con NaHCO₃ sat. ac. (300 mL), agua (300 mL), salmuera (300 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía ultrarrápida (hexanos/EtOAc 10:1 → 6:4) proporcionó el compuesto del título (*R*)-**4** (13,513 g, 65%) como un aceite transparente e incoloro. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,20 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,16 (dd, *J* = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 6,94 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 4,43 – 4,38 (m, 1H), 4,36 (dd, *J* = 11,6, 2,4 Hz, 1H), 4,34 (dd, *J* = 11,1, 4,5 Hz, 1H), 4,30 (dd, *J* = 11,6, 4,6 Hz, 1H), 4,11 (dd, *J* = 11,5, 7,2 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 170,64, 147,13, 143,11, 126,28, 121,56, 118,85, 118,32, 105,13, 71,11, 65,45, 62,24, 20,83. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₂H₁₂NO₄⁺, 234,0761; hallada, 234,0759.

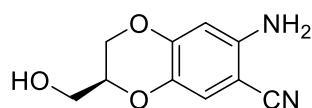
10 Acetato de [(2*R*)-7-ciano-6-nitro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il]metilo ((*R*)-**5**).



Una mezcla de (*R*)-**4** (13,345 g, 57,2 mmol) en Ac₂O (74,3 mL) se trató con H₂SO₄ (3,05 mL, 57,2 mmol), se enfrió hasta 0 °C y se trató por goteo con HNO₃ al 70% (19,63 mL, 286 mmol) a 0 °C durante 35 min. La mezcla se agitó durante otras 2 h a 0 °C y luego a 23 °C durante 3,5 h.

15 La mezcla se vertió en agua helada (850 mL) y el pH se ajustó a ~7 con NaOH 6 M (320 mL). Se agregó NaHCO₃ sat. ac. (200 mL) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 500 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con NaHCO₃ sat. ac. (400 mL), agua (400 mL), salmuera (400 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó para proporcionar el compuesto del título (*R*)-**5** (15,696 g, 99%) como un aceite amarillo, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,96 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 4,73 – 4,67 (m, 1H), 4,58 (dd, *J* = 11,8, 2,6 Hz, 1H), 4,36 (dd, *J* = 12,5, 3,7 Hz, 1H), 4,31 (dd, *J* = 12,5, 5,7 Hz, 1H), 4,27 (dd, *J* = 11,8, 7,0 Hz, 1H), 2,05 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 170,11, 147,75, 146,26, 142,23, 123,77, 115,21, 115,17, 100,06, 72,00, 64,98, 61,72, 20,52. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₂H₁₁N₂O₆⁺, 279,0612; hallada, 279,0601.

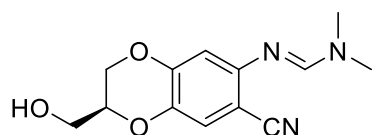
25 (3*S*)-7-amino-3-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-carbonitrilo ((*S*)-**6**).



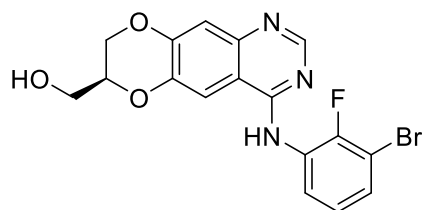
Una suspensión de (*R*)-**5** (15,591 g, 56 mmol) en agua/etanol 1:1 (250 mL) se trató con Na₂S₂O₄ (39,266 g, 185 mmol) y la mezcla se agitó a 50 °C durante 105 min, y luego se calentó a 70 °C durante 2 h mientras se trataba en partes con HCl conc. (73,6 mL, 0,897 mol) durante ese tiempo. La mezcla se enfrió hasta 23 °C, se vertió sobre hielo y el pH se ajustó a ~10 con NaOH 6 M (200 mL) y NaHCO₃ semi-sat. (500 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 500 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (500 mL), salmuera (500 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron para proporcionar (*S*)-**6** crudo (9,483 g, 82%) como un sólido color amarillo anaranjado, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6,92 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 5,50 (br, 2H), 5,04 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,32 (dd, *J* = 10,7, 1,6 Hz, 1H), 4,07 – 3,99 (m, 1H), 4,00 (dd, *J* = 11,2, 8,3 Hz, 1H), 3,64 – 3,51 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 148,50, 147,29, 134,39, 119,04, 118,04, 102,45, 86,72, 73,25, 65,92, 59,77. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₀H₁₀N₂O₃⁺, 206,0686; hallada, 206,0685.

N'-[(2*S*)-7-ciano-2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il]-*N,N*-dimetilmetan-imidamida ((*S*)-7).



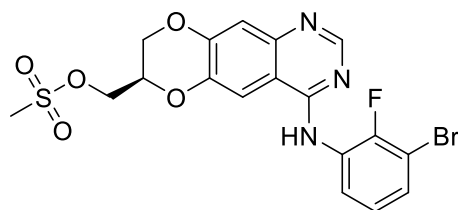
Se trató una mezcla de (*S*)-6 (9,38 g, 45,5 mmol) en tolueno (117 mL) con AcOH (143 μ L, 2,5 mmol) y DMF-DMA (13,1 mL, 98,9 mmol) y la mezcla se agitó a 105 °C durante 3 h. El MeOH evaporado (~4 – 5 mL) se recogió en una trampa Dean-Stark para controlar el progreso de la reacción. La mezcla se enfrió hasta 23 °C y se evaporó para obtener (*S*) -7 bruto (14,243 g, cuant.) como un aceite marrón viscoso, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7,51 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 4,33 (dd, J = 11,2, 2,0 Hz, 1H), 4,23 – 4,17 (m, 1H), 4,13 (dd, J = 11,2, 8,1 Hz, 1H), 3,90 (dd, J = 12,1, 4,2 Hz, 1H), 3,83 (dd, J = 12,1, 4,8 Hz, 1H), 3,07 (s, 3H), 3,05 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 160,40, 153,78, 147,68, 138,63, 121,08, 118,64, 108,16, 99,31, 73,34, 65,83, 61,67, 40,51, 34,82. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3^+$, 262,1186; hallada, 262,1183. [(7*S*)-4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-7-il]metanol ((*S*)-8).



Se trató una mezcla de (*S*)-7 en AcOH (152 mL) con 3-bromo-2-fluoroanilina (6,63 mL, 59,1 mmol) y la mezcla se agitó a 125 – 130 °C durante 3 h. La mezcla se enfrió hasta 23 °C, se vertió en agua helada (500 mL) y el pH se ajustó a ~9 con NH_4OH sat. ac. (185 mL) y NaHCO_3 semi-sat. ac. (200 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 400 mL) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaHCO_3 semi-sat. ac. (400 mL), agua (400 mL), salmuera (400 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió en MeOH (272 mL) y se trató con K_2CO_3 (12,579 g, 91 mmol), se agitó a 23 °C durante 1 h y se evaporó. El residuo se suspendió en NH_4Cl semi-sat. ac. (700 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 400 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (400 mL), salmuera (400 mL), se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se evaporaron. El residuo de color amarillo anaranjado se suspendió en EtOAc, se calentó hasta 65 °C y luego se dejó enfriar lentamente hasta 23 °C durante la noche. La filtración y el lavado del residuo con hexanos fríos (2 x 15 mL) y Et_2O (2 x 15 mL) y el secado a alto vacío proporcionaron el compuesto del título (*S*)-8 (9,407 g, 50,9% en dos etapas) como un polvo amarillo fino. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,69 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,59 (ddd, J = 8,0, 6,2, 1,6 Hz, 1H), 7,54 (ddd, J = 8,4, 7,0, 1,6 Hz, 1H), 7,24 – 7,17 (m, 1H), 7,20 (s, 1H), 5,20 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,49 (dd, J = 11,5, 2,4 Hz, 1H), 4,37 – 4,29 (m, 1H), 4,21 (dd, J = 11,6, 7,4 Hz, 1H), 3,76 – 3,64 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,22, 153,38 (d, J_{CF} = 247,0 Hz), 153,09, 148,87, 145,94, 143,37, 130,08, 128,09 (d, J_{CF} = 12,9 Hz), 127,75, 125,43 (d, J_{CF} = 4,5 Hz), 112,29, 109,81, 108,54 (d, J_{CF} = 20,0 Hz), 108,49, 73,77, 65,52, 59,76. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrFN}_3\text{O}_3^+$, 406,0197; hallada, 406,0185.

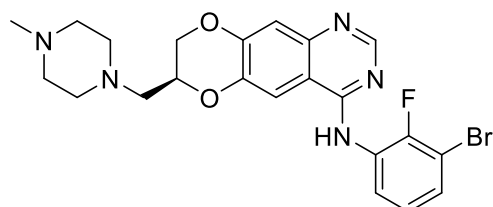
Metanesulfonato de [(7*R*)-4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-

7-il]metilo ((*R*)-**9**).

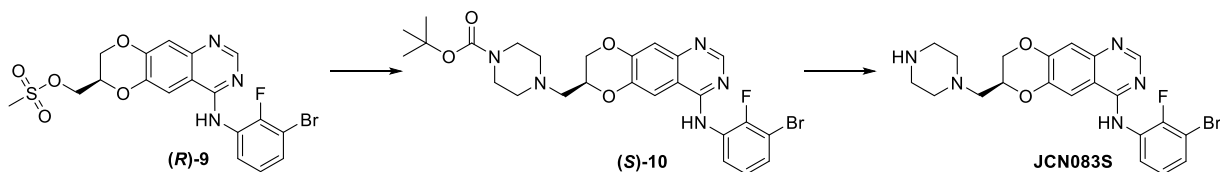


Una mezcla de (*S*)-**8** (9,01 g, 22,2 mmol) y Me₃N•HCl (234 mg, 2,45 mmol) en acetonitrilo (148 mL) con Et₃N (6,18 mL, 44,4 mmol), se enfrió hasta 0 – 5 °C y se trató por goteo con una solución de MsCl (2,57 mL, 33,2 mmol) en acetonitrilo (17 mL; se enjuagó con 3 mL) durante 10 min. La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. Se añadió agua (100 mL) y la mayor parte del acetonitrilo se evaporó al vacío. Se agregó agua adicional (700 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 × 400 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (400 mL), salmuera (400 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título (*R*)-**9** (10,33 g, 96%) como una espuma friable color amarillo, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,70 (s, 1H), 8,62 (ddd, *J* = 8,7, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,362 (s, 1H), 7,360 (br, 1H), 7,29 (ddd, *J* = 8,1, 6,5, 1,5 Hz, 1H), 7,11 (td, *J* = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,67 – 4,61 (m, 1H), 4,54 – 4,51 (m, 2H), 4,50 (dd, *J* = 11,7, 2,4 Hz, 1H), 4,29 (dd, *J* = 11,8, 7,1 Hz, 1H), 3,13 (s, 3H).

(*7S*)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino [2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK068S**).

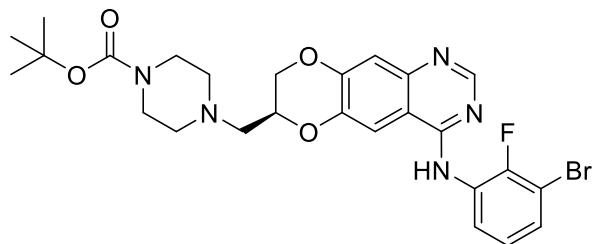


Se trató una mezcla de (*R*)-**9** en DMF (427 mL) con 1-metilpiperazina (11,83 mL, 107 mmol) y Et₃N (5,95 mL, 42,7 mmol) y la mezcla se agitó a 85 °C durante 24 h. La mezcla se enfrió hasta 23 °C y se evaporó. El residuo se disolvió en EtOAc (1,2 L) y se lavó con NaOH 0,5 M (4 x 250 mL), salmuera (250 mL), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía ultrarrápida (CH₂Cl₂/MeOH 1:0 → 8:2) proporcionó el compuesto del título **JGK068S** (6,013 g, 58% en dos etapas) como una espuma friable blancuzca. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,67 (s, 1H), 8,63 (ddd, *J* = 8,7, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,374 (s, 1H), 7,372 (br, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,26 (ddd, *J* = 8,1, 6,5, 1,5 Hz, 1H), 7,09 (td, *J* = 8,2, 1,6 Hz, 1H), 4,48 – 4,40 (m, 2H), 4,14 (dd, *J* = 11,8, 8,0 Hz, 1H), 2,77 (dd, *J* = 13,4, 6,0 Hz, 1H), 2,653 (dd, *J* = 13,4, 5,8 Hz, 1H), 2,648 (br, 4H), 2,51 (br, 4H), 2,32 (s, 3H).



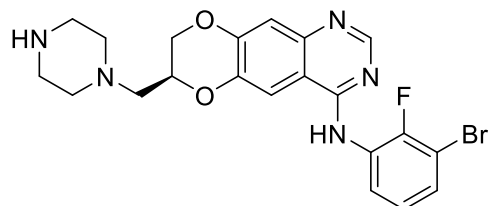
Esquema 4. Síntesis de JGK083S.

{[(*7S*)-4-(3-bromo-2-fluoroanilino)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-7-il]metil}piperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo ((*S*)-**10**).



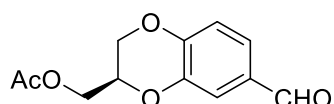
Seguendo el procedimiento general **GP-1** del Ejemplo 16, se preparó el compuesto (S)-**10** a partir de *R*-**9** (91 mg, 0,188 mmol) y piperazina-1-carboxilato de *terc*-butilo (175 mg, 0,94 mmol) en DMF (3,8 mL) y se agitó a 85 °C durante 15 h. La PTLC (CH₂Cl₂/EtOAc 4:6) proporcionó (S)-**10** (50 mg, 46%) como una espuma friable blancuzca, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,68 (s, 1H), 8,65 (ddd, *J* = 8,3, 7,4, 1,5 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,36 (br, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,27 (ddd, *J* = 8,0, 6,5, 1,5 Hz, 1H), 7,11 (td, *J* = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,50 – 4,42 (m, 2H), 4,17 (dd, *J* = 12,1, 8,2 Hz, 1H), 3,47 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H), 2,78 (dd, *J* = 13,4, 5,9 Hz, 1H), 2,67 (dd, *J* = 13,5, 5,9 Hz, 1H), 2,62 – 2,47 (m, 4H), 1,47 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 155,89, 154,83, 153,39, 150,15 (d, *J*_{CF} = 242,4 Hz), 149,36, 146,72, 144,02, 128,63 (d, *J*_{CF} = 10,3 Hz), 127,27, 125,34, 121,78, 114,34, 110,66, 108,60 (d, *J*_{CF} = 19,5 Hz), 106,06, 79,97, 71,76, 67,18, 58,56, 53,96, 28,57, falta una señal de carbono (probablemente debido a picos superpuestos). HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₂₆H₃₀BrFN₅O₄⁺, 574,1460; hallada, 574,1432.

(7*S*)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[(piperazin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino [2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK083S**).



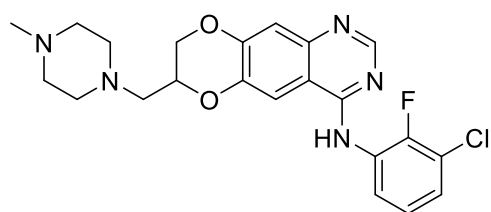
Se agitó una mezcla de (S)-**10** (42 mg, 0,073 mmol) en CH₂Cl₂ (500 μL) y TFA (250 μL) a 23 °C durante 12 h. La mezcla se diluyó con HCl 1 M (20 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 7 mL). La fase acuosa se diluyó con NaOH 6 M (4 mL) a pH >12 y se extrajo con EtOAc (3 x 8 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (8 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron. La purificación mediante PTLC (CH₂Cl₂/MeOH 8:2) proporcionó el compuesto del título **JGK083S** (18 mg, 52%) como una espuma friable blanca. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,68 (s, 1H), 8,66 (ddd, *J* = 8,2, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,35 (br d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,27 (ddd, *J* = 8,1, 6,5, 1,6 Hz, 1H), 7,11 (td, *J* = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 4,50 – 4,42 (m, 2H), 4,19 – 4,13 (m, 1H), 2,93 (t, *J* = 4,9 Hz, 4H), 2,76 (dd, *J* = 13,4, 5,9 Hz, 1H), 2,63 (dd, *J* = 13,4, 6,0 Hz, 1H), 2,63 – 2,50 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 155,88, 153,35, 150,12 (d, *J*_{CF} = 242,3 Hz), 149,45, 146,71, 144,17, 128,67 (d, *J*_{CF} = 10,4 Hz), 127,21, 125,32 (d, *J*_{CF} = 4,7 Hz), 121,74, 114,30, 110,64, 108,58 (d, *J*_{CF} = 19,3 Hz), 106,02, 71,70, 67,32, 59,19, 55,54, 46,23. HRMS (DART): *m/z* [M – H][–] calculada para C₂₁H₂₀BrFN₅O₂[–], 472,0790; hallada, 472,0773.

Acetato de [(2*R*)-7-Formil-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il]metilo ((*R*)-**10**).



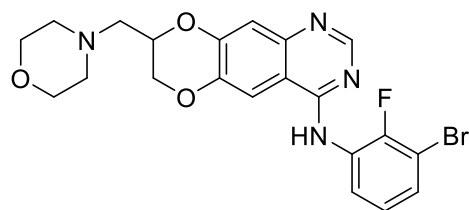
Una mezcla de **1** (150 mg, 0,833 mmol) y tosilato de (2*R*)-glicidilo (203 mg, 0,891 mmol) en DMF (2 mL) se trató con K₂CO₃ (181 mg, 1,31 mmol), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 15 h. La mezcla se enfrió hasta 23 °C, se agregó agua (30 mL) y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 × 15 mL). Los orgánicos combinados se lavaron con agua (15 mL), salmuera (15 mL), se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se evaporaron. La purificación mediante cromatografía de capa fina preparativa (hexanos/EtOAc 7:3) proporcionó el compuesto del título (*R*)-**10** (111 mg, 56%) como un aceite transparente e incoloro. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9,82 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,42 (dd, *J* = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 4,46 – 4,39 (m, 1H), 4,37 (dd, *J* = 11,5, 2,4 Hz, 1H), 4,35 (dd, *J* = 11,7, 4,9 Hz, 1H), 4,31 (dd, *J* = 11,9, 5,1 Hz, 1H), 4,13 (dd, *J* = 11,5, 7,1 Hz, 1H), 2,11 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 190,72, 170,67, 148,57, 143,22, 131,15, 124,38, 118,76, 117,85, 70,94, 65,54, 62,36, 20,83. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₁₂H₁₃O₅⁺, 237,0757; hallada, 237,0745.

(±)-*N*-(3-cloro-2-fluorofenil)-7-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino [2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK075**).



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,68 (s, 1H), 8,61 (td, *J* = 7,3, 2,2 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,35 (br d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,16 (td, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 7,13 (td, *J* = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 4,49 – 4,41 (m, 2H), 4,15 (dd, *J* = 11,8, 8,1 Hz, 1H), 2,78 (dd, *J* = 13,4, 5,9 Hz, 1H), 2,66 (dd, *J* = 13,4, 5,9 Hz, 1H), 2,64 (br, 4H), 2,48 (br, 4H), 2,31 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 155,89, 153,35, 149,44, 149,30 (d, *J*_{CF} = 244,2 Hz), 146,72, 144,15, 128,76 (d, *J*_{CF} = 9,3 Hz), 124,71 (d, *J*_{CF} = 4,7 Hz), 124,45, 121,01, 120,85 (d, *J*_{CF} = 16,1 Hz), 114,30, 110,63, 106,05, 71,81, 67,31, 58,50, 55,17, 54,15, 46,19. HRMS (DART): *m/z* [M + H]⁺ calculada para C₂₂H₂₄ClFN₅O₂⁺, 444,1597; hallada, 444,1582.

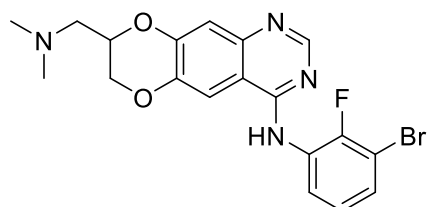
(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[(morfolin-4-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK076**).



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,62 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,59 (ddd, *J* = 8,0, 6,2, 1,6 Hz, 1H), 7,54 (ddd, *J* = 8,5, 7,1, 1,6 Hz, 1H), 7,21 (td, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 7,19 (s, 1H), 4,63 – 4,56 (m, 1H), 4,46 (dd, *J* = 11,6, 2,5 Hz, 1H), 4,17 (dd, *J* = 11,6, 7,1 Hz, 1H), 3,59 (t, *J* = 4,6 Hz, 4H), 2,71 – 2,59 (m, 2H), 2,57 – 2,44 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 157,22, 153,37 (d, *J*_{CF} = 247,3 Hz), 153,13, 148,75, 146,16, 143,28, 130,14, 128,02 (d, *J*_{CF} = 13,0 Hz), 127,74, 125,45 (d, *J*_{CF} = 4,7 Hz), 112,57, 109,61, 108,55 (d, *J*_{CF} = 19,9 Hz), 108,23, 71,41, 66,29, 66,18, 57,97, 53,89. HRMS (DART): *m/z* [M – H][–] calculada para C₂₁H₁₉BrFN₄O₃[–], 473,0630;

hallada, 473,0608.

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[(dimetilamino)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK077**).

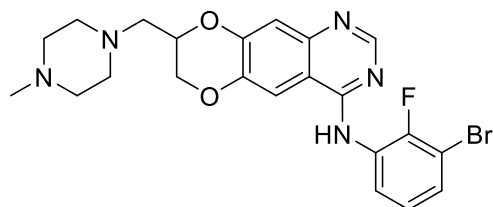


5

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,62 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,59 (ddd, $J = 8,0, 6,2, 1,6$ Hz, 1H), 7,54 (ddd, $J = 8,5, 7,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H), 7,17 (s, 1H), 4,57 – 4,51 (m, 1H), 4,44 (dd, $J = 11,6, 2,5$ Hz, 1H), 4,14 (dd, $J = 11,7, 7,1$ Hz, 1H), 2,58 (s, 1H), 2,57 (s, 1H), 2,25 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,22, 153,38 (d, $J_{\text{CF}} = 247,4$ Hz), 153,12, 148,78, 146,16, 143,29, 130,14, 128,02 (d, $J_{\text{CF}} = 13,1$ Hz), 127,75, 125,45 (d, $J_{\text{CF}} = 4,4$ Hz), 112,54, 109,59, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,8$ Hz), 108,20, 71,76, 66,31, 58,73, 45,92. HRMS (DART): m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrFN}_4\text{O}_2^-$, 431,0524; hallada, 431,0503.

10

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK078**).



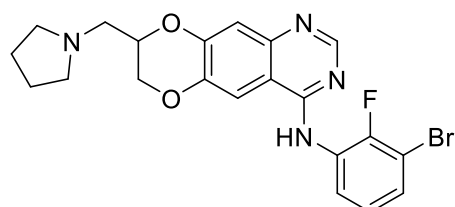
15

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,61 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,59 (ddd, $J = 8,0, 6,2, 1,6$ Hz, 1H), 7,54 (ddd, $J = 8,5, 7,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H), 7,19 (s, 1H), 4,60 – 4,53 (m, 1H), 4,44 (dd, $J = 11,6, 2,5$ Hz, 1H), 4,14 (dd, $J = 11,7, 7,1$ Hz, 1H), 2,68 – 2,59 (m, 2H), 2,53 (br, 4H), 2,34 (br, 4H), 2,16 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,22, 153,38 (d, $J_{\text{CF}} = 247,4$ Hz), 153,12, 148,78, 146,15, 143,29, 130,13, 128,02 (d, $J_{\text{CF}} = 13,1$ Hz), 127,74, 125,45 (d, $J_{\text{CF}} = 4,5$ Hz), 112,55, 109,60, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,8$ Hz), 108,22, 71,57, 66,34, 57,52, 54,68, 53,29, 45,72. HRMS (DART): m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{BrFN}_5\text{O}_2^-$, 486,0946; hallada, 486,0928.

20

25

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[(pirrolidin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK079**).

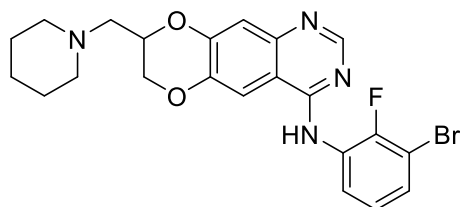


30

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,61 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,59 (ddd, $J = 8,0, 6,3, 1,6$ Hz, 1H), 7,54 (ddd, $J = 8,5, 7,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,0, 1,2$ Hz, 1H), 7,19 (s, 1H), 4,57 – 4,49 (m, 1H), 4,46 (dd, $J = 11,6, 2,5$ Hz, 1H), 4,16 (dd, $J = 11,6, 7,1$ Hz, 1H), 2,80 (dd, $J = 12,8, 6,0$ Hz, 1H), 2,73 (dd, $J = 12,8, 6,2$ Hz, 1H), 2,62 – 2,48 (m, 4H), 1,74 – 1,66 (m, 4H). ^{13}C

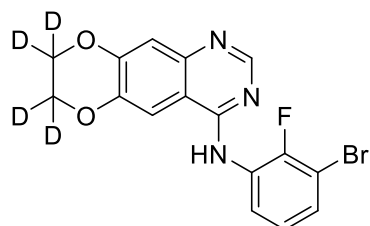
NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,22, 153,37 (d, $J_{\text{CF}} = 247,5$ Hz), 153,12, 148,79, 146,17, 143,29, 130,13, 128,02 (d, $J_{\text{CF}} = 12,9$ Hz), 127,74, 125,45 (d, $J_{\text{CF}} = 4,5$ Hz), 112,54, 109,58, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 20,0$ Hz), 108,19, 72,65, 66,32, 55,42, 54,31, 23,23. HRMS (DART): m/z $[M - H]^-$ calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrFN}_4\text{O}_2^-$, 457,0681; hallada, 457,0660.

- 5 ($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[(piperidin-1-il)metil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK080**).



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,61 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,59 (ddd, $J = 8,0, 6,3, 1,6$ Hz, 1H), 7,54 (ddd, $J = 8,4, 7,0, 1,6$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H), 7,18 (s, 1H), 4,59 – 4,52 (m, 1H), 4,44 (dd, $J = 11,6, 2,5$ Hz, 1H), 4,14 (dd, $J = 11,7, 7,1$ Hz, 1H), 2,65 – 2,54 (m, 2H), 2,53 – 2,37 (m, 4H), 1,55 – 1,47 (m, 4H), 1,43 – 1,34 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,21, 153,37 (d, $J_{\text{CF}} = 247,1$ Hz), 153,11, 148,83, 146,15, 143,32, 130,12, 128,03 (d, $J_{\text{CF}} = 13,1$ Hz), 127,73, 125,45 (d, $J_{\text{CF}} = 4,5$ Hz), 112,53, 109,57, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,8$ Hz), 108,19, 71,63, 66,42, 58,35, 54,74, 25,61, 23,83. HRMS (DART): m/z $[M - H]^-$ calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{BrFN}_4\text{O}_2^-$, 471,0837; hallada, 471,0814.

N-(3-bromo-2-fluorofenil)(7,7,8,8- $^2\text{H}_4$)-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amino (**JGK081**).

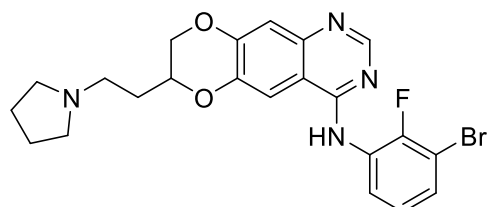


20

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,61 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,59 (ddd, $J = 7,9, 6,3, 1,6$ Hz, 1H), 7,54 (ddd, $J = 8,4, 7,1, 1,6$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H), 7,19 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,19, 153,37 (d, $J_{\text{CF}} = 247,2$ Hz), 153,10, 149,27, 146,03, 143,67, 130,12, 128,03 (d, $J_{\text{CF}} = 13,0$ Hz), 127,74, 125,44 (d, $J_{\text{CF}} = 4,2$ Hz), 112,47, 109,63, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,9$ Hz), 108,35. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{D}_4\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$, 380,0342; hallada, 380,0327.

25

($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[2-(pirrolidin-1-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK084**).

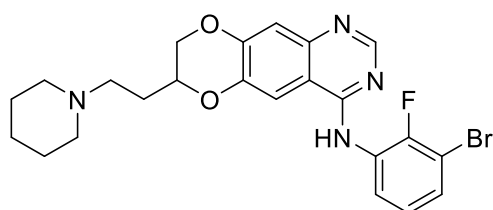


30

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,60 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,58 (ddd, $J = 8,0, 6,2, 1,6$ Hz, 1H), 7,53 (ddd, $J = 8,4, 7,0, 1,6$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,1, 1,1$ Hz, 2H), 7,20 (s, 1H), 4,50

(dd, $J = 11,5$, $2,3$ Hz, $1H$), $4,42 - 4,36$ (m, $1H$), $4,12$ (dd, $J = 11,5$, $7,7$ Hz, $1H$), $2,70 - 2,56$ (m, $2H$), $2,49 - 2,40$ (m, $4H$), $1,89 - 1,78$ (m, $2H$), $1,73 - 1,64$ (m, $4H$). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,21, 153,33 (d, $J_{CF} = 247,5$ Hz), 153,13, 148,95, 146,02, 143,37, 130,08, 128,07 (d, $J_{CF} = 13,1$ Hz), 127,64, 125,48 (d, $J_{CF} = 4,6$ Hz), 112,26, 109,78, 108,58 (d, $J_{CF} = 19,8$ Hz), 108,44, 71,76, 67,78, 53,63, 51,03, 29,53, 23,16. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{22}H_{23}BrFN_4O_2^+$, 473,0983; hallada, 473,0976.

($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-7-[2-(piperidin-1-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK085**).



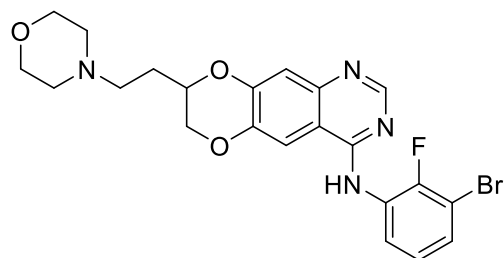
10

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,60 (s, $1H$), 8,33 (s, $1H$), 7,94 (s, $1H$), 7,58 (ddd, $J = 8,0$, $6,2$, $1,6$ Hz, $1H$), 7,53 (ddd, $J = 8,4$, $7,1$, $1,6$ Hz, $1H$), 7,204 (td, $J = 8,2$, $1,3$ Hz, $1H$), 7,198 (s, $1H$), 4,51 (dd, $J = 11,5$, $2,4$ Hz, $1H$), $4,39 - 4,33$ (m, $1H$), $4,11$ (dd, $J = 11,6$, $7,8$ Hz, $1H$), $2,50 - 2,44$ (m, $2H$), $2,42 - 2,27$ (m, $4H$), $1,90 - 1,76$ (m, $2H$), $1,55 - 1,45$ (m, $4H$), $1,42 - 1,34$ (m, $2H$). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,20, 153,33 (d, $J_{CF} = 247,4$ Hz), 153,12, 148,95, 146,02, 143,39, 130,08, 128,07 (d, $J_{CF} = 13,1$ Hz), 127,64, 125,48 (d, $J_{CF} = 4,5$ Hz), 112,25, 109,77, 108,58 (d, $J_{CF} = 20,0$ Hz), 108,43, 71,97, 67,80, 54,08, 53,96, 27,69, 25,61, 24,12. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{23}H_{25}BrFN_4O_2^+$, 487,1139; hallada, 487,1137.

15

($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[2-(morfolin-4-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK086**).

20

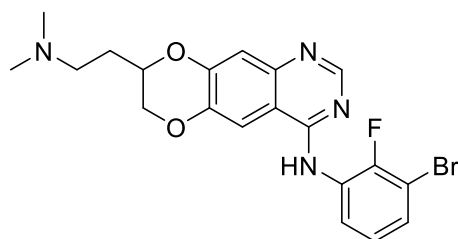


^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,63 (s, $1H$), 8,32 (s, $1H$), 7,93 (s, $1H$), 7,58 (ddd, $J = 8,0$, $6,3$, $1,5$ Hz, $1H$), 7,53 (t, $J = 7,0$ Hz, $1H$), 7,21 (td, $J = 8,1$, $1,2$ Hz, $1H$), 4,50 (dd, $J = 11,5$, $2,4$ Hz, $1H$), $4,47 - 4,40$ (m, $1H$), $4,10$ (dd, $J = 11,6$, $7,4$ Hz, $1H$), 3,58 (t, $J = 4,7$ Hz, $4H$), $2,55 - 2,46$ (m, $2H$), $2,45 - 2,33$ (m, $4H$), $1,92 - 1,79$ (m, $2H$). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 157,20, 153,33 (d, $J_{CF} = 248,3$ Hz), 153,06, 148,94, 146,06, 143,26, 130,03, 128,12 (d, $J_{CF} = 9,8$ Hz), 127,69, 125,44 (d, $J_{CF} = 4,4$ Hz), 112,47, 109,64, 108,55 (d, $J_{CF} = 19,9$ Hz), 108,18, 72,30, 67,35, 66,22, 53,53, 53,28, 27,25. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{22}H_{23}BrFN_4O_3^+$, 489,0932; hallada, 489,0926.

25

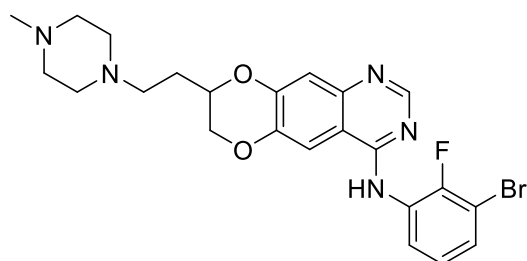
30

($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[2-(dimetilamino)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK087**).



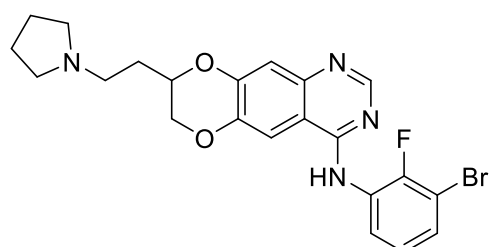
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,61 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,59 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H), 7,54 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,18 (s, 1H), 4,49 (dd, $J = 11,6, 2,3$ Hz, 1H), 4,45 – 4,38 (m, 1H), 4,09 (dd, $J = 11,6, 7,5$ Hz, 1H), 2,47 – 2,38 (m, 2H), 2,17 (s, 6H), 1,86 – 1,78 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,20, 153,37 (d, $J_{\text{CF}} = 247,6$ Hz), 153,08, 148,99, 146,14, 143,29, 130,10, 128,07 (d, $J_{\text{CF}} = 15,6$ Hz), 127,72, 125,44 (d, $J_{\text{CF}} = 4,4$ Hz), 112,50, 109,58, 108,54 (d, $J_{\text{CF}} = 19,7$ Hz), 108,13, 72,30, 67,36, 54,43, 45,17, 28,27. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$, 447,0826; hallada, 447,0818.

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK088**).



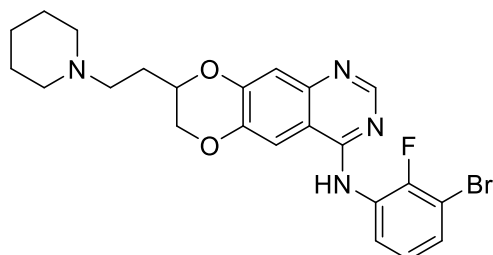
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,62 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,59 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,54 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,17 (s, 1H), 4,49 (dd, $J = 11,5, 2,4$ Hz, 1H), 4,45 – 4,38 (m, 1H), 4,10 (dd, $J = 11,6, 7,4$ Hz, 1H), 2,48 – 2,21 (m, 10H), 2,14 (s, 3H), 1,91 – 1,76 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,20, 153,36 (d, $J_{\text{CF}} = 246,9$ Hz), 153,08, 148,98, 146,13, 143,28, 130,09, 128,05 (d, $J_{\text{CF}} = 11,7$ Hz), 127,72, 125,44 (d, $J_{\text{CF}} = 4,3$ Hz), 112,50, 109,58, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,8$ Hz), 108,13, 72,40, 67,37, 54,78, 53,11, 52,65, 45,76, 27,61. HRMS (DART): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BrFN}_5\text{O}_2^+$, 502,1248; hallada, 502,1240.

(±)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[2-(pirrolidin-1-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK089**).



^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,62 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,59 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,17 (s, 1H), 4,49 (dd, $J = 11,5, 2,4$ Hz, 1H), 4,47 – 4,41 (m, 1H), 4,10 (dd, $J = 11,5, 7,4$ Hz, 1H), 2,68 – 2,53 (m, 2H), 2,50 – 2,40 (m, 4H), 1,89 – 1,81 (m, 2H), 1,73 – 1,65 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,20, 153,36 (d, $J_{\text{CF}} = 246,9$ Hz), 153,07, 148,98, 146,13, 143,28, 130,07, 128,10, 127,71, 125,44 (d, $J_{\text{CF}} = 4,6$

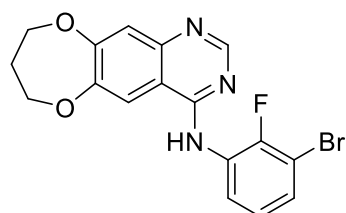
Hz), 112,48, 109,60, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,8$ Hz), 108,15, 72,31, 67,37, 53,57, 50,97, 29,58, 23,14. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$, 473,0983; hallada, 473,0976. ($\pm$)-*N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8-[2-(piperidin-1-il)etil]-7,8-dihidro[1,4]dioxino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK090**).



5

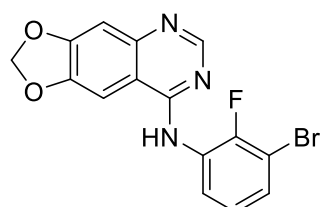
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,62 (s, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,59 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,53 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,21 (td, $J = 8,0, 1,2$ Hz, 1H), 7,17 (s, 1H), 4,49 (dd, $J = 11,5, 2,4$ Hz, 1H), 4,44 – 4,37 (m, 1H), 4,10 (dd, $J = 11,6, 7,4$ Hz, 1H), 2,48 – 2,43 (m, 2H), 2,41 – 2,27 (m, 4H), 1,90 – 1,77 (m, 2H), 1,54 – 1,45 (m, 4H), 1,42 – 1,34 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 157,19, 153,34 (d, $J_{\text{CF}} = 246,7$ Hz), 153,07, 149,00, 146,11, 143,29, 130,07, 128,10, 127,71, 125,44 (d, $J_{\text{CF}} = 4,3$ Hz), 112,48, 109,60, 108,55 (d, $J_{\text{CF}} = 19,9$ Hz), 108,14, 72,50, 67,40, 54,02, 53,87, 27,70, 25,63, 24,13. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{BrFN}_4\text{O}_2^+$, 487,1139; hallada, 487,1133.

15 *N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-8,9-dihidro-7H-[1,4]dioxepino[2,3-*g*]quinazolin-4-amina (**JGK091**).



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,71 (s, 1H), 8,65 (ddd, $J = 8,3, 7,3, 1,5$ Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,39 (br, 1H), 7,28 (ddd, $J = 8,1, 6,5, 1,5$ Hz, 1H), 7,11 (td, $J = 8,2, 1,6$ Hz, 1H), 4,41 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,38 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 2,32 (p, $J = 5,8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 157,06, 156,08, 153,93, 151,62, 150,19 (d, $J_{\text{CF}} = 242,7$ Hz), 147,83, 128,53 (d, $J_{\text{CF}} = 10,4$ Hz), 127,39, 125,32 (d, $J_{\text{CF}} = 4,7$ Hz), 121,84, 119,15, 111,47, 110,85, 108,62 (d, $J_{\text{CF}} = 19,3$ Hz), 70,86, 70,51, 31,03. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrFN}_3\text{O}_2^+$, 390,0248; hallada, 390,0236.

25 *N*-(3-bromo-2-fluorofenil)-2H-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]quinazolin-8-amina (**JGK092**).



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8,69 (s, 1H), 8,58 (ddd, $J = 8,3, 7,3, 1,5$ Hz, 1H), 7,28 (ddd, $J = 8,1, 6,5, 1,6$ Hz, 1H), 7,25 (br, 1H), 7,14 (s, 1H), 7,11 (td, $J = 8,2, 1,6$ Hz, 1H), 6,17 (s, 2H), falta señal de un protón (probablemente oculta por la señal de cloroformo). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 156,10, 153,37, 153,22, 150,22 (d, $J_{\text{CF}} = 242,3$ Hz), 149,37, 148,43, 128,67 (d, $J_{\text{CF}} =$

30

10,4 Hz), 127,28, 125,30 (d, $J_{CF} = 4,7$ Hz), 121,84, 110,75, 108,64 (d, $J_{CF} = 19,4$ Hz), 106,29, 102,48, 96,49. HRMS (DART): m/z $[M + H]^+$ calculada para $C_{15}H_{10}BrFN_3O_2^+$, 361,9935; hallada, 361,9925.

Ejemplo 19: Estudios metabólicos de compuestos ilustrativos de la serie JGK

- 5
- Se incubaron compuestos ilustrativos (10 mM) en microsomas de hígado de ser humano, de perro, ratón o rata (1 mg/mL) durante hasta 90 minutos a 37 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de acetonitrilo. Los estudios de microsomas de control (libres de compuesto) se realizaron en paralelo. Los estudios de LCMS se realizaron en un Waters Xevo G2 QTof equipado con una columna Luna Omega Polar C18, 1,6 m, 2,1 x 30 mm. Las
- 10
- estructuras de metabolitos ilustrativos se representan en la FIG. 47.

Modificación	Humano (%)	Perro (%)	Ratón (%)	Rata (%)
1. Original	67,0	3,5	59,9	70,2
2. Hidroxilación	6,0	0,0	0,0	4,8
3. N-desmetilación	13,7	0,9	5,4	8,2
4. Hidroxilación	4,2	61,9	22,0	21,9
5. Hidroxilación	0,7	0,0	0,0	0,6
6. N-desalquilación	6,5	0,0	1,3	2,7

INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

- Todas las publicaciones y patentes que se mencionan en la presente se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia, como si se indicara de manera específica e independiente que cada publicación o patente independiente sea incorporada mediante
- 15
- referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluidas todas las definiciones de la presente.

EQUIVALENTES

- Si bien se han discutido modalidades específicas de la presente invención, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Diversas variantes de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente memoria descriptiva y las
- 20
- reivindicaciones que se encuentran más adelante. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones, junto con su alcance completo de equivalentes, y la memoria descriptiva, junto con tales variaciones.