

COMPUESTOS QUÍMICOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a derivados de piridina sustituidos que son inhibidores de la actividad de DNA metiltransferasa 1 (DNMT1). La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y a los métodos de uso de dichos compuestos en el tratamiento del cáncer, síndromes precancerosos, trastornos por hemoglobinopatía beta y otras enfermedades asociadas a la actividad inadecuada de DNMT1.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La epigenética es una forma de activar y desactivar genes independientemente de la secuencia de DNA subyacente. La metilación del DNA que se produce en los promotores de genes es un ejemplo de marca epigenética represiva que provoca la compactación de cromatina y el silenciamiento de genes. La metilación del DNA está mediada por la familia de la DNA metiltransferasa (DNMT), que comprende cinco miembros. Tres de los miembros de la familia, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, contienen actividad DNA metiltransferasa. Estos tres miembros son responsables de establecer el patrón de metilación del DNA *de novo*, mientras que DNMT1 también es responsable de mantener el patrón de metilación en las cadenas hijas tras la replicación del DNA.

En el cáncer, los patrones de metilación del DNA se vuelven aberrantes, lo que da como resultado una hipometilación global y una hipermetilación localizada en las regiones promotoras. Esto puede provocar el silenciamiento gen abajo de los genes supresores de tumores (Ting *et al.* Genes Dev. 2006; 20:3215-3231). Además, el silenciamiento de DNMT1 da lugar a la desmetilación del DNA y a la reexpresión de genes supresores de tumores, lo que da como resultado la inhibición del crecimiento tumoral (Zhou *et al.* Oncol. Lett. 2014; 5: 2130-2134). Los inhibidores de la metilación del DNA (denominados agentes hipometilantes del DNA) son terapias anticancerosas validadas clínicamente que se utilizan para el tratamiento de MDS, AML y CMML. Aunque estos agentes están disponibles, todavía existen oportunidades significativas de mejora con respecto

a la toxicidad, utilidad en los tumores sólidos y biodisponibilidad oral. Por lo tanto, un nuevo inhibidor de DNMT sería interesante para el tratamiento del cáncer y/o cualquier enfermedad o afección mediada por la metilación del DNA. Un interés particular de esta invención es dirigirse específicamente a DNMT1 para prevenir la propagación de patrones de metilación anormales (tales como los que se producen en el cáncer) a las cadenas hijas durante la replicación.

Los trastornos de la hemoglobina, tales como anemia de células falciformes y talasemia beta, representan las enfermedades sanguíneas hereditarias más comunes en el mundo. La anemia de células falciformes y la talasemia beta se caracterizan por trastornos de la hemoglobina, que es el complejo proteico que transporta el oxígeno en los glóbulos rojos. Estructuralmente, la hemoglobina se compone normalmente de dos pares de proteínas más cuatro moléculas de hemo. Los adultos y niños de más de aproximadamente cuatro meses expresan una forma de hemoglobina denominada hemoglobina adulta, que consiste predominantemente en dos proteínas de globina alfa emparejadas con dos proteínas de globina beta más cuatro moléculas de hemo. Sin embargo, los fetos y los lactantes suelen expresar principalmente hemoglobina fetal, que está compuesta por dos proteínas de globina alfa emparejadas con dos proteínas de globina gamma más cuatro moléculas de hemo. Hay que tener en cuenta que existen dos formas de globina gamma, denominadas G-gamma y A-gamma, que están codificadas por dos genes diferentes (*HBG1* y *HBG2*) pero que son funcionalmente equivalentes en gran medida; la hemoglobina fetal se refiere a cualquier combinación de un par de proteínas G-gamma y/o A-gamma más un par de proteínas globina alfa más cuatro moléculas de hemo.

En la anemia de células falciformes, el gen que codifica la globina beta contiene una mutación que origina una estructura anormal de la hemoglobina y hace que los glóbulos rojos adopten una forma característica de hoz en determinadas condiciones. Esta forma de hoz conduce a una menor plasticidad de los glóbulos rojos, tiempos de tránsito capilar más largos y procesos vaso oclusivos frecuentes que pueden dañar los tejidos y provocar la morbilidad del paciente.

En cambio, la talasemia beta se caracteriza por una producción inadecuada de globina beta que se combina con la globina alfa producida normalmente. La acumulación resultante de globina alfa es tóxica para los precursores de los glóbulos rojos y provoca una eritropoyesis ineficaz y una extensa hemólisis de los glóbulos rojos.

En la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico aprobado para curar la anemia de células falciformes o la talasemia beta. Sin embargo, se ha demostrado que el aumento del número de glóbulos rojos que producen hemoglobina fetal, combinado con el aumento general del contenido de hemoglobina fetal por glóbulo rojo, proporciona un beneficio clínico en los pacientes con anemia de células falciformes y anemia drepanocítica al reducir la frecuencia de las crisis vaso oclusivas agudas. Además, aunque no se ha demostrado clínicamente, la biología de la enfermedad de talasemia beta sugiere que el aumento de la producción de hemoglobina fetal a concentraciones altas también puede ser una estrategia viable para el tratamiento de esta enfermedad. El objeto de este enfoque terapéutico, la desrepresión de los genes *HBG1* y *HBG2* silenciados, puede estar dirigido a través la intervención en un proceso epigenético en eritropoyesis. Los cambios en la metilación del DNA son eventos determinantes clave en el curso de la hematopoyesis, que marcan hitos de diferenciación que dan como resultado compromisos con varios linajes celulares. Durante la eritropoyesis, una rápida disminución de la metilación global del DNA marca un punto de compromiso hacia la expresión de los reguladores específicos eritroides GATA1 y KLF1, y la supresión de los reguladores progenitores hematopoyéticos GATA2 y PU.1 (1, 2). En el caso de las células progenitoras eritroides de la médula ósea adulta, el DNA de la región promotora del gen *HBB* de globina beta se desmetila, lo que corresponde a una expresión de alta concentración de la proteína globina beta. Por el contrario, los promotores de los loci *HBG1* y *HBG2* están altamente metilados, lo que provoca una gran disminución de la expresión de las proteínas de globina gamma (3). Aunque las DNA metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B se expresan cada una en

los progenitores eritroides, la expresión relativamente mayor de DNMT1, en particular en las etapas finales de la diferenciación eritroide, sugiere que desempeña un papel dominante en la regulación del gen de globina (2). La 5-azacitidina y la 5-aza-2'-deoxicitidina (decitabina) son inhibidores pan-DNMT conocidos como inductores de la hemoglobina fetal en las células progenitoras eritroides. En el cultivo de células eritroides y en un modelo *in vivo* de inducción de hemoglobina fetal (4, 5), el tratamiento con estos agentes provoca una disminución de la metilación de los sitios CpG en los promotores de *HBG* con el correspondiente aumento de la expresión de la proteína globina gamma. Además, en un conjunto limitado de estudios clínicos, ambos agentes provocaron un aumento de la hemoglobina fetal en pacientes con anemia de células falciformes, anemia drepanocítica y talasemia beta (6-9). Si bien son eficaces para inducir la hemoglobina fetal, estos agentes no se han utilizado ampliamente para tratar la anemia de células falciformes, anemia drepanocítica o talasemia beta debido a la preocupación por la seguridad a largo plazo, las toxicidades que limitan la dosis y una vía de dosificación inadecuada.

References

- (1) Pop R, Shearstone JR, Shen Q, Liu Y, Hallstrom K, Koulis M, et al. A key commitment step in erythropoiesis is synchronized with the cell cycle clock through mutual inhibition between PU.1 and S-phase progression. 2010;8.
- (2) Shearstone JR, Pop R, Bock C, Boyle P, Meissner A, Socolovsky M. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis *in vivo*. 2011;334:799-802.
- (3) Mabaera R, Richardson CA, Johnson K, Hsu M, Fiering S, Lowrey CH. Developmental- and differentiation-specific patterns of human α_1 - and α_2 -globin promoter DNA methylation. 2007;110:1343-52.
- (4) Chin J, Singh M, Banzon V, Vaitkus K, Ibanez V, Kouznetsova T, et al. Transcriptional activation of the α_1 -globin gene in baboons treated with decitabine and in cultured erythroid progenitor cells involves different mechanisms. 2009;37:1131-42.

(5) Akpan I, Banzon V, Ibanez V, Vaitkus K, DeSimone J, Lavelle D. Decitabine increases fetal hemoglobin in Papio anubis by increasing γ -globin gene transcription. 2010;38:989-93.

(6) Dover GJ, Charache SH, Boyer SH, Talbot J, Smith KD. 5-Azacytidine increases fetal hemoglobin production in a patient with sickle cell disease. 1983;134:475-88.

(7) Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D, Molokie R, Dorn L, Bressler L, et al. Effects of 5-aza-2G α -deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. 2003;102:3865-70

(8) Ley TJ, DeSimone J, Noguchi CT, Turner PH, Schechter AN, Heller P, et al. 5-Azacytidine increases γ -globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. 1983;62:370-80.

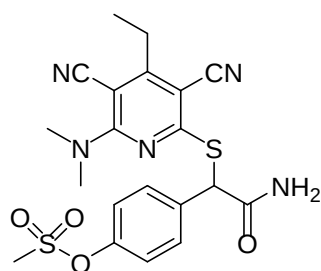
(9) Lowrey CH, Nienhuis AW. Brief report: Treatment with azacitidine of patients with end-stage α -thalassemia. 1993;329:845-8.

Un objeto de la invención implica proporcionar un compuesto novedoso que sea un inhibidor de DNMT1.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se dirige a compuestos novedosos.

Específicamente, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I)



(I)

y profármacos de este, y sales de estos.

La invención se dirige además a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención se dirige además a métodos de tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad inadecuada de DNMT1 que comprenden la administración de una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

La invención se dirige además a un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en terapia médica.

La invención se dirige además a un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a una actividad inadecuada de DNMT1.

La invención se dirige además al uso de un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a la actividad inadecuada de DNMT1.

La invención también se dirige a combinaciones que comprenden un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más agentes terapéuticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una difracción de rayos X en polvos de la sal de glicinato del compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 2 es una calorimetría diferencial de barrido de la sal de glicinato del compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 3 es una calorimetría diferencial de barrido de la sal de glicinato del compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 4 es una difracción de rayos X en polvos de la sal de glicinato del compuesto del Ejemplo 1, monohidrato.

La Figura 5 es una calorimetría diferencial de barrido de la sal de glicinato del compuesto del Ejemplo 1, monohidrato.

La Figura 6 es un análisis termogravimétrico de la sal de glicinato del compuesto del Ejemplo 1, monohidrato.

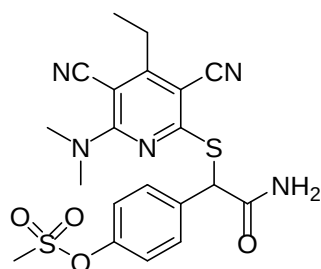
La Figura 7 es una difracción de rayos X en polvos del compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 8 es una calorimetría diferencial de barrido del compuesto del Ejemplo 1.

Figura 9. Análisis termogravimétrico del compuesto del Ejemplo 1

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I)



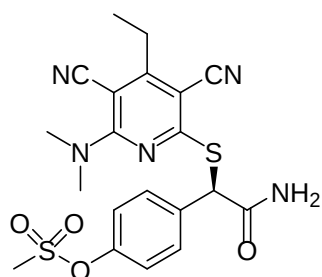
(I)

y profármacos de este, y sales de estos (en adelante “compuestos de la invención”).

Los compuestos de la invención contienen al menos un centro asimétrico (también denominado centro quiral) y pueden, por lo tanto, existir como enantiómeros individuales, diastereómeros u otras formas estereoisoméricas, o como mezclas de estos. Los centros quirales, tales como los átomos de carbono quirales, también pueden estar presentes en un sustituyente tal como un grupo alquilo. Cuando no se especifica la estereoquímica de un centro quiral presente en un compuesto de la invención, o en cualquier estructura química ilustrada en el presente documento, la estructura pretende abarcar cualquier estereoisómero y todas las mezclas de estos. Así, los compuestos de la invención pueden

utilizarse como mezclas racémicas, mezclas enriquecidas enantioméricamente o como estereoisómeros individuales enantioméricamente puros.

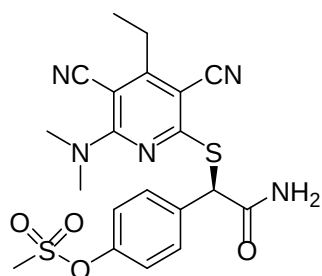
Por lo tanto, en una realización, el compuesto de la invención es un compuesto de fórmula (II)



(II)

o un profármaco de este, o una sal de este.

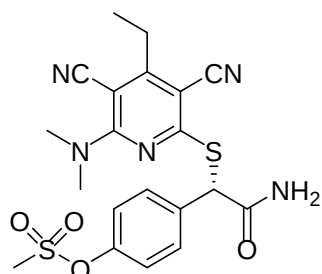
En otra realización, el compuesto de la invención es un compuesto de fórmula (II)



(II)

o un profármaco de este.

En una realización adicional, el compuesto de la invención es un compuesto de fórmula (III)



o un profármaco de este, o una sal de este.

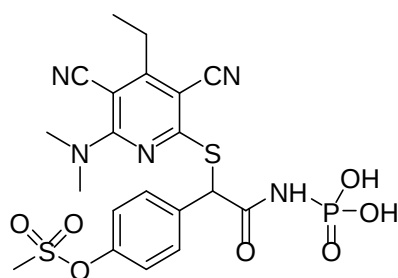
Los estereoisómeros individuales de un compuesto de la invención pueden resolverse con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dicha resolución puede llevarse a cabo (1) mediante la formación de sales, complejos u otros derivados diastereoisoméricos; (2) mediante una reacción selectiva con un reactivo específico del estereoisómero, por ejemplo, mediante oxidación o reducción enzimática; o (3) mediante cromatografía líquida o gas-líquida en un entorno quiral, por ejemplo, en un soporte quiral tal como la sílice con un ligando quiral unido o en presencia de un disolvente quiral. El experto en la técnica apreciará que cuando el estereoisómero deseado se convierte en otra entidad química mediante uno de los procedimientos de separación descritos anteriormente, se requiere un paso adicional para liberar la forma deseada. Alternativamente, pueden sintetizarse estereoisómeros específicos mediante síntesis asimétrica al utilizar reactivos, sustratos, catalizadores o disolventes ópticamente activos, o al convertir un enantiómero en el otro por transformación asimétrica.

Los compuestos de la invención también pueden contener centros de asimetría geométrica. Cuando la estereoquímica de un centro de asimetría geométrica presente en un compuesto de la invención, o en cualquier estructura química ilustrada en el presente documento, no se especifica, la estructura pretende abarcar el isómero geométrico trans, el isómero geométrico cis y todas las mezclas de estos. Del mismo modo, también se incluyen todas las formas tautoméricas, independientemente de que dichos tautómeros existan en equilibrio o predominen en una forma.

Los compuestos de la invención pueden administrarse como profármacos. Como se usa en el presente documento, un “profármaco” de un compuesto de fórmula (I) es un derivado funcional del compuesto que, tras su administración a un paciente, libera eventualmente el compuesto de fórmula (I) *in vivo*. La administración de un compuesto de fórmula (I) como un profármaco puede permitir al experto en la técnica realizar una o más de las siguientes acciones: (a) modificar la solubilidad del compuesto *in vivo*, (b) modificar el inicio de la

actividad del compuesto *in vivo*; (c) modificar la duración de la acción del compuesto *in vivo*; (d) modificar el transporte o la distribución del compuesto *in vivo*; y (e) superar un efecto secundario u otra dificultad que se presente con el compuesto. Los derivados funcionales típicos utilizados para preparar profármacos incluyen modificaciones del compuesto que son química o enzimáticamente escindibles *in vivo*. Dichas modificaciones, que incluyen la preparación de fosfatos, amidas, ésteres, tioésteres, carbonatos y carbamatos, son bien conocidas por los expertos en la técnica. En una realización, la porción de profármaco es $-P(O)(OH)_2$.

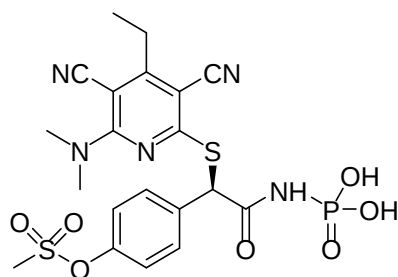
Por lo tanto, en una realización, el compuesto de la invención es un profármaco de fórmula (IV)



(IV)

o una sal de este.

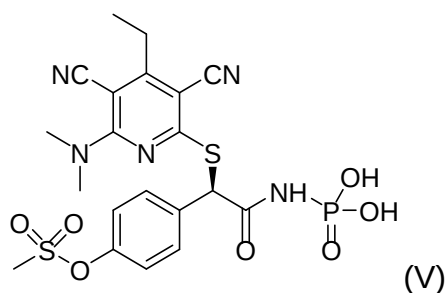
En otra realización, el compuesto de la invención es el profármaco de fórmula (V)



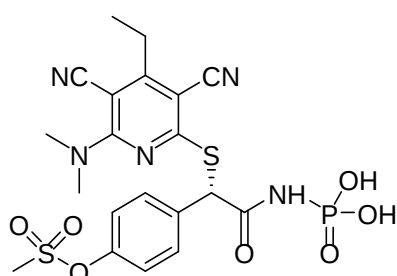
(V)

o una sal de este.

En otra realización, el compuesto de la invención es el profármaco de fórmula (V)



En una realización adicional, el compuesto de la invención es el profármaco de fórmula (VI)



(VI)

o una sal de este.

Debe entenderse que las referencias en el presente documento a un compuesto de fórmula (I) y profármacos de este, y sales de estos, abarcan el compuesto de fórmula (I) y profármacos de este como ácidos libres o bases libres, o como sales de este, por ejemplo como sales farmacéuticamente aceptables de este. Por lo tanto, en una realización, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este como el ácido libre o la base libre. En otra realización, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal de este. En una realización adicional, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I) o a un profármaco de este, o a una sal farmacéuticamente aceptable de este.

El experto en la técnica apreciará que pueden prepararse sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos según la fórmula (I) o un profármaco de estos. De hecho, en determinadas realizaciones de la invención, pueden preferirse las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto según la fórmula (I) o un profármaco de este sobre la base libre o el ácido libre

respectivos, porque dichas sales pueden impartir una mayor estabilidad o solubilidad a la molécula, facilitando así la formulación en una forma farmacéutica.

Como se usa en el presente documento, el término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto en cuestión y presentan efectos toxicológicos mínimos no deseados. Estas sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales del compuesto, o al hacer reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o base libre, o una sal farmacéuticamente no aceptable, con una base o un ácido adecuados, respectivamente.

Las sales y solvatos que tienen contraiones farmacéuticamente no aceptables o disolventes asociados están dentro del alcance de la invención, por ejemplo, para su uso como productos intermedios en la preparación del compuesto de fórmula (I) o profármaco de este y sus sales farmacéuticamente aceptables. Así, una realización de la invención abarca un compuesto de fórmula (I) y los profármacos de este, y sales de estos.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, las descritas en Berge, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19, o las que figuran en P H Stahl y C G Wermuth, editores, *Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection and Use, Second Edition* Stahl/Wermuth: Wiley- VCH/VHCA, 2011 (véase <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-3906390519.html>).

En determinadas realizaciones, un compuesto según la fórmula (I) o un profármaco de este puede contener un grupo funcional ácido. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de dichos grupos funcionales ácidos. Las sales representativas incluyen, a mero título enunciativo, aluminio, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS, trometamina), arginina, benetamina (*N*-bencilfenetilamina), benzatina (*N,N'*-dibenciletilendiamina), *bis*-(2-hidroxietil)amina, bismuto, calcio, cloroprocaína, colina, clemizol (1-*p* clorobencil-2-pirrolildin-1'-ilmetilbencimidazol),

ciclohexilamina, dibenciletilendiamina, dietilamina, dietiltriaina, dimetilamina, dimetiletanolamina, dopamina, etanolamina, etilendiamina, L-histidina, hierro, isoquinolina, lepidina, litio, L-lisina, magnesio, meglumina (N-metilglucamina), piperazina, piperidina, potasio, procaína, quinina, quinolina, sodio, estroncio, *t*-butilamina, betaína (trimetilglicina), L-prolina, L-fenilalanina, L-alanina, L-tirosina, L-leucina, imidazol, glicina, L-valina, L-serina, morfolina, tricolina, dietienetriamina, 1-(2-hidroxietil)-2-pirrolidina y zinc.

Dichas sales de adición de bases pueden formarse mediante la reacción de un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este (que, por ejemplo, contiene un ácido carboxílico u otro grupo funcional ácido) con la base adecuada, opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico, para proporcionar la sal que puede aislarse mediante uno o más de una serie de métodos, incluidos cristalización y filtración.

Se entenderá que si un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este contiene dos o más porciones básicas, la estequiometría de la formación de sal puede incluir 1, 2 o más equivalentes de ácido. Dichas sales contendrían 1, 2 o más contraiones ácidos, por ejemplo, una sal de diclorhidrato.

Las formas estequiométricas y no estequiométricas de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este se incluyen dentro del alcance de la invención, incluidas las sales subestequiométricas, por ejemplo, cuando un contraión contiene más de un protón ácido.

En determinadas realizaciones, un compuesto según la fórmula (I) o un profármaco de este puede contener un grupo funcional básico y, por lo tanto, son capaces de formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables por tratamiento con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados incluyen ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables y ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, a mero título enunciativo, 4-acetamidobenzoato, acetato, adipato, alginato, ascorbato,

aspartato, bencenosulfonato (besilato), benzoato, bisulfato, bitartrato, butirato, edetato de calcio, canforato, canforsulfonato (camilato) , caprato (decanoato), caproato (hexanoato), caprilato (octanoato), cinamato, citrato, ciclamato, digluconato, 2,5-dihidroxibenzoato, disuccinato, dodecilsulfato (estolato), edetato (etilendiaminotetraacetato), estolato (lauril sulfato sódico), etano-1,2-disulfonato (edisilato), etanosulfonato (esilato), formiato, fumarato, galactarato (mucato), gentisato (2,5-dihidroxibenzoato), glucoheptonato (gluceptato), gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicerofosforato, glicolato, hexilresorcinato, hipurato, hidrabamina (*N,N'*-di(deshidroabietil)-etilendiamina), hidrobromuro, hidrocloruro, hidroyoduro, hidroxinaftoato, isobutirato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, malonato, mandelato, metanosulfonato (mesilato), metilsulfato, mucato, naftaleno-1,5-disulfonato (napadisilato), naftaleno-2-sulfonato (napsilato), nicotinato, nitrato, oleato, palmitato, *p*-aminobencenosulfonato, *p*-aminosalicilato, pamoato (embonato), pantotenato, pectinato, persulfato, fenilacetato, feniletilbarbitúrico, fosfato, poligalacturonato, propionato, *p*-toluenosulfonato (tosilato), piroglutamato, piruvato, salicilato, sebacato, estearato, subacetato, succinato, sulfamato, sulfato, tanato, tartrato, teoclato (8-cloroteofilinato), tiocianato, tritioduro, undecanoato, undecilenato y valerato.

Dichas sales de adición de ácido pueden formarse mediante la reacción de un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este (que, por ejemplo, contiene una amina básica u otro grupo funcional básico) con el ácido adecuado, opcionalmente en un disolvente adecuado tal como una sustancia orgánica disolvente, para proporcionar la sal que puede aislarse mediante uno o más de una serie de métodos, incluidos cristalización y filtración.

Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este. Si un compuesto básico de fórmula (I) o profármaco de este se aísla como una sal, la forma de base libre correspondiente de ese compuesto puede prepararse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluido el tratamiento de la sal con

una base orgánica o inorgánica. De manera similar, si un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este que contiene un ácido carboxílico u otro grupo funcional ácido se aísla como una sal, la forma de ácido libre correspondiente de ese compuesto puede prepararse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluido el tratamiento de la sal con un ácido orgánico o inorgánico.

Dentro del alcance de los “compuestos de la invención” se incluyen todos los isómeros ópticos, estereoisómeros, polimorfos y derivados radiomarcados de los compuestos de fórmula (I) y profármacos de estos, y sales de estos.

Los compuestos de la invención pueden existir en forma sólida o líquida. En estado sólido, los compuestos de la invención pueden existir en forma cristalina o no cristalina, o como una mezcla de estas. Para los compuestos de la invención que se presentan en forma cristalina, el experto en la técnica apreciará que pueden formarse solvatos farmacéuticamente aceptables donde las moléculas del disolvente se incorporan a la red cristalina durante la cristalización. Los compuestos de la invención pueden existir en forma solvatada y no solvatada. Los solvatos pueden incluir disolventes no acuosos tales como etanol, isopropanol, DMSO, ácido acético, etanolamina y EtOAc, o pueden incluir agua como el disolvente que se incorpora a la red cristalina. Los solvatos donde el agua es el disolvente que se incorpora a la red cristalina suelen denominarse “hidratos”. Los hidratos incluyen hidratos estequiométricos, así como composiciones que contienen cantidades variables de agua.

El experto en la técnica apreciará además que ciertos compuestos de la invención que existen en forma cristalina, incluidos los diversos solvatos de estos, pueden presentar polimorfismo (es decir, la capacidad de manifestarse en diferentes estructuras cristalinas). Estas diferentes formas cristalinas se conocen normalmente como “polimorfos”. La invención incluye todos estos polimorfos. Los polimorfos tienen la misma composición química pero difieren en el empaquetamiento, la disposición geométrica y otras propiedades descriptivas del estado sólido cristalino. Los polimorfos, por lo tanto, pueden tener diferentes propiedades físicas tales como forma, densidad, dureza, deformabilidad,

estabilidad y propiedades de disolución. Los polimorfos suelen presentar diferentes puntos de fusión, espectros IR y patrones de difracción de rayos X en polvos, que pueden utilizarse para su identificación. El experto en la técnica apreciará que pueden producirse diferentes polimorfos, por ejemplo, al cambiar o ajustar las condiciones de reacción o los reactivos, utilizados para elaborar el compuesto. Por ejemplo, los cambios de temperatura, presión o disolvente pueden dar lugar a polimorfos. Además, un polimorfo puede convertirse espontáneamente en otro bajo ciertas condiciones.

La invención también incluye compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los compuestos de la invención, pero por el hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que posee una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra más frecuentemente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y flúor, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{14}C y ^{18}F .

“Enriquecido enantioméricamente” se refiere a productos cuyo exceso enantiomérico es superior a cero. Por ejemplo, enriquecido enantioméricamente se refiere a productos cuyo exceso enantiomérico es superior al 50% ee, superior al 75% ee y superior al 90% ee.

“Exceso enantiomérico” o **“ee”** es el exceso de un enantiómero sobre el otro expresado en porcentaje. Como resultado, dado que ambos enantiómeros están presentes en cantidades iguales en una mezcla racémica, el exceso enantiomérico es cero (0% ee). Sin embargo, si un enantiómero se enriqueciera de forma que constituyera el 95% del producto, el exceso enantiomérico sería del 90% ee (la cantidad del enantiómero enriquecido, 95%, menos la cantidad del otro enantiómero, 5%). En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden tener al menos un 50% ee, al menos un 60% ee, al menos un 65% ee, al menos un 70% ee, al menos un 75% ee, al menos un 80% ee, al menos un 85% ee, al menos un 90% ee, al menos un 95% ee, al menos un 96%

ee, al menos un 97% ee, al menos un 98% ee, o al menos un 99% ee con respecto al enantiómero R o S.

“Enantioméricamente puro” se refiere a productos cuyo exceso enantiomérico es del 99% ee o superior.

“Farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, sales, materiales, composiciones y formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, u otro problema o complicación, conforme a una relación riesgo/beneficio razonable.

Los compuestos de la invención son útiles como inhibidores selectivos de DNMT1 en mamíferos, particularmente en humanos, que los necesiten. Los compuestos que son inhibidores de DNMT1 pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades donde la patología subyacente es (al menos en parte) atribuible a una actividad inadecuada de DNMT1, tal como cáncer. “Actividad inadecuada de DNMT1” se refiere a cualquier actividad de DNMT1 que se desvíe de la actividad normal de DNMT1 esperada en un paciente concreto. La DNMT1 inadecuada puede adoptar la forma de, por ejemplo, un aumento anormal de la actividad, o una aberración en el momento y/o el control de la actividad de DNMT1. En consecuencia, en otro aspecto, la invención se dirige a métodos para tratar dichas enfermedades.

En algunos aspectos de la invención, el compuesto de fórmula (I) y profármacos de este, y sales de estos, son potentes inhibidores de DNMT1 y son selectivos para DNMT1 sobre DNMT3A y DNMT3B.

Dichas enfermedades incluyen cáncer, síndrome precanceroso (a veces denominado afección precancerosa) o trastorno de hemoglobinopatía beta. Una afección precancerosa es una afección o lesión que involucra células anormales que se asocian con un mayor riesgo de convertirse en cáncer. Desde el punto de vista clínico, las afecciones precancerosas engloban una o más de una serie de afecciones o lesiones con un mayor riesgo de convertirse en cáncer.

Los cánceres que pueden tratarse son: adenocarcinoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinosarcoma, melanoma, cáncer de glándula suprarrenal, carcinoma adrenocortical, feocromocitoma, cáncer de mama, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma ductal invasivo, enfermedad de Paget del pezón, cáncer de mama papilar, carcinoma medular, carcinoma mamario, cáncer anal, carcinoma cloacogénico, melanoma anorrectal, cáncer apendicular, tumor neuroendocrino apendicular, cistadenocarcinomas mucinosos apendiculares, adenocarcinoma de tipo colónico, adenocarcinoma de células en anillo de sello, carcinomas de células caliciformes/adenoneuroendocrinos, cáncer de vías biliares, colangiocarcinoma intrahepático, colangiocarcinoma extrahepático, colangiocarcinoma perihiliar, colangiocarcinoma extrahepático distal, cáncer colorrectal (CRC), adenocarcinoma mucinoso, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores del estroma gastrointestinal, linfomas colorrectales primarios, leiomiosarcoma, cáncer de esófago, carcinoma microcítico, leiomioma, cáncer de vesícula biliar, adenocarcinoma no papilar, adenocarcinoma papilar, cáncer de estómago, adenocarcinoma gástrico, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, carcinoma fibrolamelar, angiosarcoma, linfangiosarcoma, hemangiosarcoma, hepatoblastoma, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal, adenocarcinoma acinar, carcinoma de células acinares, carcinoma coloide, tumor de células gigantes, carcinoma hepatoide, neoplasias quísticas mucinosas, pancreatoblastoma, cistadenoma seroso, neoplasia mucinosa papilar intraductal, tumor neuroendocrino pancreático, gastrinoma, insulinooma, glucagonoma, VIPoma, somatostatinooma, PPoma, cáncer de intestino delgado, cáncer de ojo, melanoma intraocular, linfoma intraocular, retinoblastoma intraocular, melanoma conjuntival, carcinoma de párpado, carcinoma sebáceo, tumor de la glándula lagrimal, tumor epitelial mixto maligno, carcinoma adenoide quístico, cáncer de vejiga, carcinoma urotelial, cáncer de riñón, carcinoma de células renales (RCC), RCC de células claras, RCC papilar, RCC cromóforo,

RCC de conducto colector, RCC quístico multilocular, carcinoma renal tubular mucinoso y de células fusiformes, RCC tubuloquístico, RCC folicular de tipo tiroideo, RCC asociado a enfermedad renal quística adquirida, RCC con translocación t(6; 11) (TFEB), oncocitoma híbrido/RCC cromóforo, tumor de Wilms, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de próstata resistente a la castración, carcinoma de células transicionales, cáncer de testículo, seminoma, seminoma clásico, seminoma espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de saco vitelino, coriocarcinoma, teratoma, tumores de células de Leydig, tumores de células de Sertoli, carcinoma de la rete testis, cáncer de uretra, tumor extracraneal de células germinales, germinoma, gonadoblastoma, tumor mixto de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, tumores del seno endodérmico, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de trompa de Falopio, carcinoma epitelial, disgerminoma, tumores del estroma de los cordones sexuales, tumor trofoblástico gestacional, cáncer peritoneal primario, sarcoma uterino, carcinoma seroso papilar uterino, cáncer vaginal, adenocarcinoma de células claras, cáncer vulvar, carcinoma verrugoso, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de faringe, cáncer de hipofaringe, cáncer de nasofaringe, cáncer de orofaringe, carcinoma de células escamosas no queratinizante, carcinoma indiferenciado, cáncer de laringe, cáncer de cavidad oral, cáncer de boca, carcinoma mucoepidermoide, cáncer de senos paranasales y cavidad nasal, estesioneuroblastoma, cáncer de glándulas salivales, carcinoma epitelial-mioepitelial, cáncer de paratiroides, cáncer de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma medular de tiroides, carcinoma anaplásico de tiroides, paraganglioma, paraganglioma carotídeo, paraganglioma yugulotímpico, paraganglioma vagal, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica T, leucemia linfoblástica de células B precursoras, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica

aguda, leucemia megacarioblástica aguda, eritroleucemia, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia de linfocitos grandes granulares, leucemia linfocítica granular de células T, leucemia linfocítica granular de células NK, leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica, leucemia de células plasmáticas, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin clásico, linfoma de Hodgkin clásico esclerosante nodular, linfoma de Hodgkin clásico de celularidad mixta, linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos, linfoma de Hodgkin clásico con depleción linfocitaria, linfoma de Hodgkin nodular con predominio de linfocitos, linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico primario de células B, linfoma de efusión primaria, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoblástico, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de doble hit/triple hit, linfoma de Burkitt, linfoma de tipo Burkitt, linfoma de células pequeñas no hendidas, linfoma folicular, linfoma folicular de células grandes, linfoma inmunoblástico, linfoma intravascular de células grandes, linfoma esplénico primario, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células del manto, linfoma esplénico de la zona marginal (MZL), MZL extranodal, MZL nodal, MZL esplénico, MZL esplénico con linfocitos vellosos, linfoma periférico de células T, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma/leucemia de células T del adulto, linfoma extraganglionar de células NK/T, linfoma de células T asociado a enteropatía, linfoma hepatoesplénico de células T, linfoma subcutáneo de células T tipo paniculítico, linfoma no Hodgkin de células T no especificado, linfoma de células T gamma/delta, linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, linfoma asociado al HIV, histiocitosis de células de Langerhans, mieloma múltiple, mieloma múltiple latente, mieloma múltiple activo, plasmocitoma, plasmocitoma solitario de hueso, plasmocitoma extramedular, amiloidosis primaria, síndromes mielodisplásicos (MDS), anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos

en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis, mastocitosis sistémica, cáncer óseo, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, osteosarcoma intramedular, osteosarcoma yuxtacortical, osteosarcoma extraesquelético, histiocitoma fibroso maligno de hueso, cordoma, cordoma clásico, cordoma condroide, cordoma desdiferenciado, condrosarcoma, condrosarcoma convencional, condrosarcoma de células claras, condrosarcoma mixoide, condrosarcoma mesenquimal, condrosarcoma desdiferenciado, rabdomiosarcoma, rabdomiosarcoma embrionario, rabdomiosarcoma alveolar, rabdomiosarcoma botrioide, rabdomiosarcoma pleomórfico, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma extraóseo, dermatofibrosarcoma protuberante, sarcoma epitelioides, sarcoma de Kaposi, liposarcoma, tumor maligno de la vaina del nervio periférico, fibrosarcoma, mixosarcoma, sinovioma, cáncer cerebral, astrocitoma anaplásico, glioblastoma, glioblastoma multiforme, meningioma, carcinoma hipofisario, schwannoma, oligodendroglioma, ependimoma, meduloblastoma, astrocitoma, glioma de tronco cerebral, tumor teratoide/rabdoide atípico, pinealoma, neuroblastoma, linfoma primario del CNS, tumor neuroectodérmico primitivo, glioma pontino intrínseco difuso, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), NSCLC indiferenciado, cáncer de pulmón microcítico, blastoma pleuropulmonar, carcinoma broncogénico, mesotelioma maligno, mesotelioma pleural maligno, mesotelioma peritoneal maligno, timoma, carcinoma tímico, cáncer de piel, queratoacantoma, carcinoma de glándulas sebáceas, adenocarcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma apocrino, carcinoma ecrino, carcinoma ecrino de células claras, carcinoma de células de Merkel, linfoma cutáneo de células T, micosis fungoide, síndrome de Sézary, siringoma condroide, cánceres asociados al HPV, tumores que contienen células transformadas, tumores que contienen células en estado precanceroso, hiperplasia precancerosa, metaplasia precancerosa, displasia precancerosa, carcinoma *in situ*, tumor mixto, tumor mixto maligno y carcinoma complejo.

Los cánceres que pueden tratarse también incluyen cánceres que tienen una alta carga tumoral mutacional (TMB), un sistema defectuoso de reparación de errores de desajuste de DNA (dMMR), un estado de inestabilidad de microsatélites alto (MSI-H), un estado de inestabilidad de microsatélites bajo (MSI-L), un estado elevado de inestabilidad de microsatélites (MSI-L), alteraciones de microsatélites en repeticiones de tetranucleótidos seleccionadas (EMAST), cánceres estables de microsatélites (MSS), cánceres que comprenden mutaciones en la polimerasa delta (POLD), cánceres que comprenden mutaciones en la polimerasa épsilon (POLE) o cánceres con deficiencia de reparación de la recombinación homóloga (HRD).

Los cánceres que también pueden tratarse incluyen cánceres de mama definidos por perfiles de expresión (cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama HER2 positivo, cáncer de mama luminal A, cáncer de mama luminal B, cáncer de mama normal) o cánceres de mama con mutaciones BRCA1 o BRCA2.

En una realización de la invención, el cáncer tratado es el síndrome mielodisplásico (MDS), la leucemia mieloide aguda (AML), el cáncer colorrectal (CRC), el linfoma no Hodgkin (NHL), el melanoma o el cáncer de mama. En otra realización de la invención, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML). En una realización adicional de la invención, el cáncer es cáncer colorrectal (CRC).

Los métodos de tratamiento de la invención comprenden la administración de una cantidad eficaz y segura de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita. Las realizaciones individuales de la invención incluyen métodos para tratar una cualquiera de los trastornos mencionados anteriormente mediante la administración de una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

Como se usa en el presente documento, el término “tratar” en referencia a un trastorno significa: (1) mejorar o prevenir el trastorno o una o más de las manifestaciones biológicas del trastorno; (2) interferir con (a) uno o más puntos

en la cascada biológica que conduce al trastorno o lo provoca, o (b) una o más de las manifestaciones biológicas del trastorno; (3) aliviar uno o más de los síntomas o efectos asociados con el trastorno; o (4) retrasar la progresión del trastorno o una o más de una manifestación biológica del trastorno.

Como se usa en el presente documento, la frase “cantidad segura y eficaz” en referencia a un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, u otro agente farmacéuticamente activo, alude a una cantidad del compuesto suficiente para tratar la afección del paciente, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves (con una relación riesgo/beneficio razonable) dentro del alcance del buen juicio médico. Una cantidad segura y eficaz de un compuesto variará con el compuesto particular elegido (p. ej., considerar la potencia, la eficacia y la semivida del compuesto); la vía de administración elegida; el trastorno que se está tratando; la gravedad del trastorno que se está tratando; la edad, altura, peso y condición física del paciente que está bajo tratamiento; los antecedentes clínicos del paciente que se va a tratar; la duración del tratamiento; la naturaleza de la terapia concurrente; el efecto terapéutico deseado; y factores similares, pero que, sin embargo, el experto en la materia puede determinar de forma rutinaria.

Como se usa en el presente documento, el término “paciente” se refiere a un ser humano (incluidos adultos y niños) u otro animal. En una realización, el término “paciente” se refiere a un ser humano.

Por lo tanto, la invención está destinada a proporcionar métodos para tratar enfermedades asociadas con actividad inapropiada de DNMT1, que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

En una realización, la invención proporciona un método para tratar el cáncer, un síndrome precanceroso o un trastorno de hemoglobinopatía beta que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un

profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar el cáncer, un síndrome precanceroso o un trastorno de hemoglobinopatía beta que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar el síndrome mielodisplásico (MDS), la leucemia mieloide aguda (AML), el cáncer colorrectal (CRC), el linfoma no Hodgkin (NHL), el melanoma o el cáncer de mama, que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar la leucemia mieloide aguda (LMA) que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar el cáncer colorrectal (CRC) que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para tratar la enfermedad de células falciformes, la anemia de células falciformes o la talasemia beta, que comprende administrar una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a un paciente que lo necesita. La anemia de células falciformes es una enfermedad específica única caracterizada por una mutación E6V homocigota en ambos alelos del gen de la globina beta. En contraste, la enfermedad de células falciformes es una adición de varias enfermedades relacionadas, y todas presentan síntomas similares de gravedad variable. Los

pacientes con enfermedad de células falciformes tienen un alelo del gen de la globina beta con la mutación E6V (como en la anemia de células falciformes), y el segundo alelo del gen de la globina beta tiene varias mutaciones, pero particularmente mutaciones que provocan talasemia beta. Las manifestaciones más comunes de la enfermedad de células falciformes se denominan “falciformes beta cero” y “falciformes beta plus”, pero también existen otras. Se debe tener en cuenta que el segundo alelo de globina beta en pacientes con enfermedad de células falciformes no está exenta de mutaciones (un alelo de globina beta E6V más un alelo de globina beta normal se conoce como rasgo de células falciformes, que no es totalmente benigno pero no se suele tratar), sino que las mutaciones en el segundo alelo no son la mutación E6V. Tenga en cuenta que el rasgo de células falciformes no se considera una enfermedad de células falciformes.

La invención se dirige además a un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en terapia médica.

La invención se dirige además a un compuesto de fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a una actividad inadecuada de DNMT1. La invención también está diseñada para el uso de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada con una actividad inapropiada de DNMT1.

Los compuestos de fórmula (I) y los profármacos de estos, y las sales farmacéuticamente aceptables de estos, se formularán con normalidad, pero no necesariamente, en composiciones farmacéuticas antes de la administración a un paciente.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de

este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden de 0,5 a 3500 mg de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y de 0,1 a 2 g de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad mediada por una actividad inapropiada de DNMT1 que comprende un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o las sales farmacéuticamente aceptables de este, pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada, incluidas la administración sistémica y la administración tópica. La administración sistémica incluye administración oral, administración parenteral, administración transdérmica y administración rectal. La administración parenteral se refiere a vías de administración distintas de la enteral o la transdérmica, y normalmente es por inyección o infusión. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intramuscular y subcutánea. La administración tópica incluye la aplicación sobre la piel, así como la administración intraocular, ótica, intravaginal, inhalada e intranasal. Inhalación se refiere a la administración en los pulmones del paciente, ya sea inhalada a través de la boca o a través de las vías nasales. En una realización, un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o las sales farmacéuticamente aceptables de este, pueden administrarse por vía oral.

En algunas realizaciones, determinados profármacos del compuesto de fórmula (I) pueden ser particularmente adecuados para la administración oral debido a la solubilidad mejorada que conduce a una mayor biodisponibilidad oral. Los compuestos de la fórmula (I) o las sales farmacéuticamente aceptables de este se pueden administrar una vez o según un esquema posológico donde se administra una cantidad de dosis en intervalos variados durante un periodo

determinado. Por ejemplo, las dosis pueden administrarse una, dos, tres, cuatro, cinco o seis veces al día. Las dosis pueden administrarse hasta que se logre el efecto terapéutico deseado o indefinidamente para mantener el efecto terapéutico deseado. Los esquemas posológicos adecuados para un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, dependen de las propiedades farmacocinéticas de ese compuesto, tales como la absorción, distribución y semivida, las cuales un experto en la materia puede determinar. Además, los esquemas posológicos adecuados, incluida la duración de la administración de dichos esquemas, para un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, dependen del trastorno bajo tratamiento, la gravedad de la enfermedad bajo tratamiento, la edad y condición física del paciente bajo tratamiento, los antecedentes clínicos del paciente que se tratará, la naturaleza de la terapia concurrente, el efecto terapéutico deseado y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del experto en la materia. Los expertos en la materia también comprenderán que los esquemas posológicos adecuados pueden requerir un ajuste en función de la respuesta de un individuo al esquema posológico, o bien posteriormente a medida que cambian las necesidades del individuo.

Las dosis de los compuestos farmacéuticamente activos inventados en una unidad de dosificación farmacéutica conforme se describió anteriormente serán una cantidad eficaz, no tóxica, preferentemente seleccionada del intervalo de 0,001 a 500 mg/kg de compuesto activo, preferentemente de 0,01 a 100 mg/kg. Cuando se trata a un paciente humano que necesita un inhibidor de DNMT1, la dosis seleccionada se administra preferentemente de 1 a 6 veces al día, por vía oral o parenteral. Las formas preferidas de administración parenteral incluyen por vía tópica, rectal, transdérmica, por inyección y por infusión continua. Las unidades de dosificación oral para administración humana contienen preferentemente de 0,5 a 3500 mg de compuesto activo. Las unidades de dosificación orales adecuadas para administración humana contienen

preferentemente de 0,5 a 1000 mg de compuesto activo. Se prefiere la administración oral, que utiliza dosis más bajas. Sin embargo, también se puede usar la administración parenteral, en dosis altas, cuando sea seguro y conveniente para el paciente.

Los compuestos de fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables de estos se formularán con normalidad, pero no necesariamente, en composiciones farmacéuticas antes de la administración a un paciente.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden de 0,05 a 1000 mg de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y de 0,1 a 2 g de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno mediado por una actividad inapropiada de DNMT1, que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar y envasar a granel donde se puede extraer una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este y, luego, administrarla al paciente como polvo o jarabe. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar y envasar en una forma farmacéutica unitaria, donde cada unidad físicamente discreta contiene un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Cuando se preparan en forma farmacéutica unitaria, las composiciones farmacéuticas de la invención normalmente pueden contener, por ejemplo, de 0,5 a 1000 mg, de 1 mg a 700 mg, o de 5 mg a 100 mg de un compuesto de

fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Como se usa en el presente documento, la frase “excipiente farmacéuticamente aceptable” alude a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable involucrado en dar forma o consistencia a la composición farmacéutica. Cada excipiente debe ser compatible con los demás ingredientes de la composición farmacéutica cuando se mezclan de manera que se eviten las interacciones que reducirían sustancialmente la eficacia del compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, cuando se administra a un paciente y las interacciones que darían como resultado composiciones farmacéuticas que no son farmacéuticamente aceptables. Asimismo, por supuesto, cada excipiente debe ser farmacéuticamente aceptable; por ejemplo, de una pureza suficientemente alta. El compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y el excipiente o los excipientes farmacéuticamente aceptables se formularán típicamente en una forma farmacéutica adaptada para utilizar con el paciente la vía de administración deseada. Por ejemplo, las formas de dosificación incluyen aquellas adaptadas para (1) administración oral tal como tabletas, cápsulas, comprimidos oblongos, píldoras, trociscos, polvos, jarabes, elixires, suspensiones, soluciones, emulsiones, bolsitas y sellos; (2) administración parenteral tal como soluciones estériles, suspensiones y polvos para reconstituir; (3) administración transdérmica tal como parches transdérmicos; (4) administración rectal tal como supositorios; (5) inhalación tal como aerosoles, soluciones y polvos secos; y (6) administración tópica tal como cremas, ungüentos, lociones, soluciones, pastas, aerosoles, espumas y geles.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados variarán dependiendo de la forma farmacéutica particular elegida. Además, se pueden elegir excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables para una función particular que puedan servir en la composición. Por ejemplo, se pueden elegir ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables por su capacidad para facilitar la producción de formas farmacéuticas uniformes. Se pueden elegir ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables por su capacidad para facilitar la producción de formas farmacéuticas estables. Ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden elegirse por su capacidad para facilitar el transporte de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o las sales farmacéuticamente aceptables de este, una vez administrados al paciente desde un órgano o parte del cuerpo hacia otro órgano o parte del cuerpo. Se pueden elegir ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables por su capacidad para aumentar el cumplimiento del paciente.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen los siguientes tipos de excipientes: diluyentes, cargas, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, deslizantes, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes humectantes, disolventes, codisolventes, agentes de suspensión, emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes enmascarantes con sabores, agentes colorantes, agentes antiaglomerantes, humectantes, agentes quelantes, plastificantes, agentes que aumentan la viscosidad, antioxidantes, conservantes, estabilizadores, tensioactivos y agentes tamponantes. El experto en la materia apreciará que ciertos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden tener más de una función y pueden tener funciones alternativas dependiendo de la cantidad de excipiente esté presente en la formulación y qué otros excipientes estén presentes en la formulación.

Los expertos poseen el conocimiento y la habilidad en la técnica para permitirles seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en cantidades apropiadas para su uso en la invención. Además, existen varios recursos disponibles para el experto en la técnica que describen excipientes

farmacéuticamente aceptables y pueden ser útiles para seleccionar excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados. Los ejemplos incluyen Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited) y The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press).

Las composiciones farmacéuticas de la invención se preparan usando técnicas y métodos conocidos por los expertos en la materia. Algunos de los métodos comúnmente usados en la técnica se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company).

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El proceso comprende mezclar los ingredientes. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede prepararse, por ejemplo, mezclándolo a temperatura ambiente y presión atmosférica.

En una realización, los compuestos de fórmula (I) o un profármaco de este, o las sales farmacéuticamente aceptables de este, se formularán para administración oral. En una realización adicional, los compuestos de fórmula (I) o un profármaco de este, o las sales farmacéuticamente aceptables de este, se formularán para administración parenteral.

En un aspecto, la invención está diseñada para proporcionar una forma farmacéutica oral sólida tal como un comprimido o una cápsula, que comprende una cantidad segura y eficaz de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un diluyente o relleno. Los diluyentes y rellenos adecuados incluyen lactosa, sacarosa, dextrosa, manitol, sorbitol, almidón (p. ej., almidón de maíz, almidón de patata y almidón pregelatinizado), celulosa y sus derivados (p. ej., celulosa microcristalina),

sulfato de calcio y fosfato de calcio dibásico. La forma farmacéutica sólida oral también puede comprender un aglutinante. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón (p. ej., almidón de maíz, almidón de patata y almidón pregelatinizado), gelatina, acacia, alginato de sodio, ácido algínico, tragacanto, goma guar, povidona y celulosa y sus derivados (p. ej., celulosa microcristalina). La forma farmacéutica sólida oral también puede comprender un desintegrante. Los desintegrantes adecuados incluyen crospovidona, glicolato de almidón sódico, croscarmelosa, ácido algínico y carboximetilcelulosa sódica. La forma farmacéutica sólida oral también puede comprender un lubricante. Los lubricantes adecuados incluyen ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio y talco.

Cuando sea apropiado, las formulaciones de unidades farmacéuticas para la administración oral se pueden microencapsular. La composición también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación, por ejemplo, recubriendo o incrustando material particulado en polímeros, cera o similares.

Un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, también puede acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspirtamida-fenol o polietilénóxidopolilisina sustituida con residuos de palmitoílo. Además, un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, polepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

En otro aspecto, la invención se refiere a una forma farmacéutica oral líquida. Los líquidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires se pueden preparar en forma farmacéutica unitaria de modo que una cantidad dada contenga una

cantidad predeterminada de un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Los jarabes se pueden preparar disolviendo un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en una solución acuosa aromatizada adecuadamente, mientras que los elixires se preparan mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular dispersando un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en un vehículo no tóxico. También se pueden añadir solubilizantes y emulsionantes, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos de sabor tales como aceite de menta, edulcorantes naturales, sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado disecado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, puede administrarse conjuntamente con uno o más de otros agentes activos. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más de otros agentes activos. En una realización adicional, se sabe que los otros

agentes activos son útiles en el tratamiento del cáncer o síndromes precancerosos.

Por “administración conjunta”, como se utiliza en el presente documento, se entiende la administración simultánea o cualquier forma de administración secuencial separada de un inhibidor de la actividad de DMNT1, como se describe en el presente documento, y otro agente o agentes activos, que se sabe que son útiles en el tratamiento del cáncer, incluidas la quimioterapia y radioterapia. Las demás frases “ingrediente activo”, “ingredientes activos”, “agente activo” o “agentes activos”, como se utilizan en el presente documento, incluyen cualquier compuesto o agente terapéutico conocido o que demuestre propiedades ventajosas cuando se administra a un paciente. Preferentemente, si la administración no es simultánea, los compuestos se administran con muy poco tiempo de diferencia. Además, no importa si los compuestos se administran en la misma forma farmacéutica, p. ej., un compuesto puede administrarse por inyección y otro compuesto puede administrarse por vía oral.

Típicamente, cualquier agente antineoplásico que tenga actividad frente a un tumor susceptible que se esté tratando puede coadministrarse en el tratamiento del cáncer proporcionado en la invención. Se pueden encontrar ejemplos de dichos agentes en Cancer Principles and Practice of Oncology de V.T. Devita, T.S. Lawrence y S.A. Rosenberg (editores), 10.^a edición (5 de diciembre de 2014), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Un experto en la materia podría discernir qué combinaciones de agentes serían útiles en función de las características particulares de los fármacos y el cáncer implicado. Los agentes antineoplásicos típicos útiles en la invención incluyen, a mero título enunciativo, agentes antimicrotúbulos o antimitóticos; complejos de coordinación de platino; agentes alquilantes; agentes antibióticos; inhibidores de la topoisomerasa I; inhibidores de la topoisomerasa II; antimetabolitos; hormonas y análogos hormonales; inhibidores de la vía de transducción de señales; inhibidores de la angiogénesis de la tirosina cinasa no receptora; agentes inmunoterapéuticos; agentes proapoptóticos; inhibidores de la señalización del ciclo celular;

inhibidores de proteasomas; inhibidores de proteínas de choque térmico; inhibidores del metabolismo del cáncer; y agentes de terapia génica del cáncer. Los ejemplos de un ingrediente o ingredientes activos adicionales para usar en combinación o coadministrarse con el compuesto de fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, son agentes antineoplásicos. Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, a mero título enunciativo, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunomoduladores, inmunomoduladores y adyuvantes inmunoestimuladores.

Los agentes antimicrotúbulos o antimitóticos son agentes específicos de fase activos contra los microtúbulos de las células tumorales durante la fase M o de mitosis del ciclo celular. Los ejemplos de agentes antimicrotúbulos incluyen, a mero título enunciativo, diterpenoides y alcaloides de la vinca.

Los complejos de coordinación de platino son agentes anticancerígenos no específicos por fase que interactúan con el DNA. Los complejos de platino penetran en las células tumorales, se someten a acuación y forman entrecruzamientos intra e intercatenarios con el DNA, lo que provoca efectos biológicos adversos en el tumor. Los ejemplos de complejos de coordinación de platino incluyen, a mero título enunciativo, cisplatino y carboplatino.

Los agentes alquilantes son agentes anticancerígenos no específicos por fase y electrófilos fuertes. Típicamente, los agentes alquilantes forman enlaces covalentes, por alquilación, con el DNA a través de restos nucleofílicos de la molécula de DNA tales como grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Tal alquilación interrumpe la función del ácido nucleico y provoca la muerte celular. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, a mero título enunciativo: mostazas nitrogenadas tales como ciclofosfamida, melfalán y clorambucilo; sulfonatos de alquilo tales como busulfano; nitrosoureas tales como carmustina; y triazenos tales como dacarbazina.

Los antibióticos antineoplásicos son agentes no específicos por fase, que se unen o se intercalan con el DNA. Esta acción interrumpe la función común de los ácidos nucleicos, lo que provoca la muerte celular. Los ejemplos de agentes

antibióticos antineoplásicos incluyen, a mero título enunciativo: actinomicinas tales como dactinomicina; antroclinas tales como daunorrubicina y doxorubicina; y bleomicinas.

Los inhibidores de la topoisomerasa I incluyen, a mero título enunciativo, camptotecinas. Se cree que la actividad citotóxica de las camptotecinas está relacionada con su actividad inhibidora de la topoisomerasa I.

Los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen, a mero título enunciativo, epipodofilotoxinas. Las epipodofilotoxinas son agentes antineoplásicos específicos por fase derivados de la planta de mandrágora. Las epipodofilotoxinas suelen afectar las células en las fases S y G₂ del ciclo celular, al formar un complejo ternario con la topoisomerasa II y el DNA, lo que provoca roturas en las cadenas de DNA. Las roturas de cadenas se acumulan y continúa la muerte celular. Los ejemplos de epipodofilotoxinas incluyen, a mero título enunciativo, etopósido y tenipósido.

Los agentes neoplásicos antimetabolitos son agentes antineoplásicos de fase específica que actúan en la fase S (síntesis de DNA) del ciclo celular inhibiendo la síntesis de DNA o inhibiendo la síntesis de base de purina o pirimidina y, por lo tanto, limitando la síntesis de DNA. En consecuencia, la fase S no procede y sigue la muerte celular. Los ejemplos de agentes antineoplásicos antimetabolitos incluyen, a mero título enunciativo, fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina y gemcitabina.

Las hormonas y los análogos hormonales son compuestos útiles para tratar cánceres en los que existe una relación entre la(s) hormona(s) y el crecimiento y/o falta de crecimiento del cáncer. Los ejemplos de hormonas y análogos hormonales útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, a mero título enunciativo, adrenocorticosteroides tales como prednisona y prednisolona; aminoglutetimida y otros inhibidores de la aromatasa tales como anastrozol, letazol, vorazol y exemestano; progestinas tales como acetato de megestrol; estrógenos, andrógenos y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona y 5 α -reductasas tales como finasterida y dutasterida;

antiestrógenos tales como tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, así como moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMS); y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y análogos de esta, que estimulan la liberación de hormona luteinizante (LH) y/o hormona estimulante del folículo (FSH), agonistas de LHRH y antagonistas tales como acetato de goserelina y leuprolida.

Los inhibidores de la vía de transducción de señales son aquellos inhibidores que bloquean o inhiben un proceso químico que provoca un cambio intracelular. Como se usa en el presente documento, este cambio es proliferación o diferenciación celular. Los inhibidores de la transducción de señales útiles en la invención incluyen, a mero título enunciativo, inhibidores de tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, bloqueadores del dominio SH2/SH3, serina/treonina cinasas, fosfatidil inositol-3 cinasas, señalización de mioinositol y Ras oncogenes

Varias proteínas tirosina cinasas catalizan la fosforilación de residuos de tirosilo específicos en varias proteínas involucradas en la regulación del crecimiento celular. Dichas proteínas tirosina cinasas pueden clasificarse en términos generales como cinasas receptoras o no receptoras.

Las tirosina cinasas receptoras son proteínas transmembranarias que tienen un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranario y un dominio de tirosina cinasa. Las tirosina cinasas receptoras están involucradas en la regulación del crecimiento celular y generalmente se denominan receptores de factores de crecimiento. Se ha demostrado que la activación inapropiada o descontrolada de muchas de estas cinasas, es decir, la actividad anómala del receptor del factor de crecimiento de cinasa, por ejemplo, por sobreexpresión o mutación, da como resultado un crecimiento celular descontrolado. En consecuencia, la actividad anómala de dichas cinasas se ha relacionado con el crecimiento de tejido maligno. En consecuencia, los inhibidores de dichas cinasas podrían proporcionar métodos de tratamiento del cáncer. Los receptores del factor de crecimiento incluyen, por ejemplo, el receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGFr), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr), erbB2, erbB4, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), la tirosina cinasa con dominios de homología del factor de crecimiento epidérmico y similar a la inmunoglobulina (TIE-2), receptor del factor de crecimiento de insulina –I (IGFI), factor estimulante de colonias de macrófagos Cfms), BTK, ckit, cmet, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), receptores Trk (TrkA, TrkB y TrkC), efrina (eph) y el protooncogén RET. Varios inhibidores de los receptores de crecimiento están en curso e incluyen antagonistas de ligandos, anticuerpos, inhibidores de tirosina cinasa y oligonucleótidos antisentido. Los receptores del factor de crecimiento y los agentes que inhiben la función del receptor del factor de crecimiento se describen, por ejemplo, en Kath J.C., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 10(6):803-818 (2000); Shawver L.K., *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2(2): 50-63 (1997); and Lofts, F. J. and Gullick W.J., “Growth factor receptors as targets.” in *New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy*, Kerr D.J. Y Workman P. (editors), (June 27, 1994), CRC Press. Los ejemplos no limitantes de inhibidores del receptor del factor de crecimiento incluyen pazopanib y sorafenib.

Las tirosina cinasas, que no son cinasas receptoras del factor de crecimiento, se denominan tirosina cinasas no receptoras. Las tirosina cinasas no receptoras útiles en la invención, que son objetivos u objetivos potenciales de fármacos anticancerosos, incluyen cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (cinasa de adhesión focal), tirosina cinasa de Brutons y Bcr-Abl. Dichas cinasas no receptoras y agentes que inhiben la función de tirosina cinasa no receptora se describen en Sinha S. y Corey S.J., *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 8(5): 465-480 (2004) and Bolen, J.B., Brugge, J.S., *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 371-404 (1997).

Los bloqueadores de los dominios SH2/SH3 son agentes que interrumpen la unión de los dominios SH2 o SH3 en una o más de una serie de enzimas o proteínas adaptadoras, incluidas la subunidad PI3-K p85, las cinasas de la familia Src, las moléculas adaptadoras (Shc, Crk, Nck, Grb2) y Ras-GAP. Los

dominios SH2/SH3 como objetivos para fármacos anticancerosos se analizan en Smithgall T.E., J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 34(3): 125-32 (1995).

Los inhibidores de serina/treonina cinasas incluyen, a mero título enunciativo, bloqueadores de cascada de MAP cinasas que incluyen bloqueadores de cinasas Raf (rafk), mitógenos o cinasas reguladas extracelulares (MEK) y cinasas reguladas extracelulares (ERK); Bloqueadores de miembros de la familia de la proteína cinasa C, incluidos bloqueadores de PKC (alfa, beta, gamma, épsilon, mu, lambda, iota, zeta); cinasas I κ B (IKKa, IKKb); cinasas de la familia PKB; miembros de la familia de cinasas AKT; cinasas del receptor beta de TGF; e inhibidores de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), incluidos, a mero título enunciativo, rapamicina (FK506) y rapálogos, RAD001 o everolimus (AFINITOR®), CCI-779 o temsirolimus, AP23573, AZD8055, WYE-354, WYE-600, WYE-687 y Pp121. Los ejemplos de inhibidores de serina/treonina cinasas incluyen, a mero título enunciativo, trametinib, dabrafenib e inhibidores de Akt afuresertib y N-[(1S)-2-amino-1-[(3,4-difluorofenil)metil]etilo]-5-cloro-4-(4-cloro-1-metil-1H-pirazol-5-il)-2-furancarboxamida.

Los inhibidores de los miembros de la familia de fosfatidil inositol 3-cinasa, incluidos los bloqueadores de PI3-cinasa, ATM, DNA-PK y Ku, también son útiles en la invención. Tales cinasas se discuten en Abraham R.T., Curr. Opin. Immunol., 8(3): 412-418 (1996); Canman C.E., and Lim D.S., Oncogene, 17(25): 3301-3308 (1998); Jackson S.P., Int. J. Biochem. Cell Biol., 29(7): 935-938 (1997); and Zhong H., *et al.*, Cancer Res., 60(6): 1541-1545 (2000).

También son útiles en la invención los inhibidores de señalización de mioinositol tales como bloqueadores de fosfolipasa C y análogos de mioinositol. Dichos inhibidores de señales se describen en Powis G. y Kozikowski A., "Inhibitors of Myo-Inositol Signaling" en New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, Kerr D.J. and Workman P. (editors), (27 de junio de 1994), CRC Press.

Otro grupo de inhibidores de la vía de transducción de señales son los inhibidores del oncogén Ras. Dichos inhibidores incluyen inhibidores de

farnesiltransferasa, geranil-geranil transferasa y endopeptidasas CAAX, así como oligonucleótidos antisentido, ribozimas y otras inmunoterapias. Se ha demostrado que tales inhibidores bloquean la activación de ras en células que contienen ras mutante de tipo natural, y así actúan como agentes antiproliferación. La inhibición del oncogén Ras se trata en Scharovsky O.G., *et al.*, J. Biomed. Sci., 7(4): 292-298 (2000); Ashby M.N., Curr. Opin. Lipidol., 9(2): 99-102 (1998); and Bennett C.F. and Cowser L.M., Biochim. Biophys. Acta., 1489(1): 19-30 (1999).

Los antagonistas de la unión del ligando del receptor cinasa también pueden servir como inhibidores de la transducción de señales. Este grupo de inhibidores de la vía de transducción de señales incluye el uso de anticuerpos humanizados u otros antagonistas del dominio de unión al ligando extracelular de las tirosina cinasas receptoras. Los ejemplos de anticuerpos u otros antagonistas de la unión del ligando del receptor cinasa incluyen, a mero título enunciativo, cetuximab (ERBITUX®), trastuzumab (HERCEPTIN®); trastuzumab emtansina (KADCYLA®); pertuzumab (PERJETA®); inhibidores de ErbB, incluidos lapatinib, erlotinib y gefitinib; y anticuerpo específico 2C3 VEGFR2 (véase Brekken R.A., *et al.*, Cancer Res., 60(18): 5117-5124 (2000)).

Los inhibidores de la angiogénesis de la cinasa no receptora también pueden encontrar uso en la invención. Los inhibidores de VEGFR y TIE2 relacionados con la angiogénesis se analizan anteriormente con respecto a los inhibidores de la transducción de señales (ambos receptores son tirosina cinasas receptoras). La angiogénesis en general está relacionada con la señalización de erbB2/EGFR, ya que se ha demostrado que los inhibidores de erbB2 y EGFR inhiben la angiogénesis, principalmente la expresión de VEGF. En consecuencia, los inhibidores de la tirosina cinasa que no son receptores pueden usarse en combinación con los inhibidores de EGFR/erbB2 de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF, que no reconocen el VEGFR (el receptor tirosina cinasa), pero se unen al ligando; inhibidores de molécula pequeña de integrina ($\alpha_v\beta_3$) que inhibirán la angiogénesis; la endostatina y la angiostatina (no

RTK) también pueden resultar útiles en combinación con los compuestos de la divulgación. (Véase Bruns C.J., *et al.*, *Cancer Res.*, 60(11): 2926-2935 (2000); Schreiber A.B., *et al.*, *Science*, 232(4755): 1250-1253 (1986); Yen L., *et al.*, *Oncogene*, 19(31): 3460-3469 (2000)).

Los agentes usados en regímenes inmunoterapéuticos también pueden ser útiles en combinación con la invención. Hay una serie de estrategias inmunológicas para generar una respuesta inmunitaria contra erbB2 o EGFR. Estas estrategias están generalmente en el ámbito de las vacunas contra tumores. La eficacia de los enfoques inmunológicos se puede mejorar en gran medida mediante la inhibición combinada de las vías de señalización de erbB2/EGFR utilizando un inhibidor de molécula pequeña. La discusión del enfoque de vacuna inmunológica/tumoral contra erbB2/EGFR se encuentra en Reilly R.T., *et al.*, *Cancer Res.*, 60(13): 3569-3576 (2000); and Chen Y., *et al.*, *Cancer Res.*, 58(9): 1965-1971 (1998).

Los agentes usados en esquemas de tratamiento proapoptóticos (p. ej., oligonucleótidos antisentido Bcl-2) también pueden usarse en la combinación de la invención. Los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 bloquean la apoptosis. Por lo tanto, la regulación por incremento de Bcl-2 se ha relacionado con la quimiorresistencia. Los estudios han demostrado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula a los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (es decir, Mcl-1). Por lo tanto, las estrategias diseñadas para regular a la baja la expresión de Bcl-2 en tumores han demostrado beneficio clínico. Dichas estrategias proapoptóticas que utilizan la estrategia de oligonucleótidos antisentido para Bcl-2 se analizan en Waters J.S., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 18(9): 1812-1823 (2000); y Kitada S., *et al.*, *Antisense Res. Dev.*, 4(2): 71-79 (1994).

Los inhibidores de la señalización del ciclo celular inhiben las moléculas implicadas en el control del ciclo celular. Una familia de proteínas cinasas denominadas cinasas dependientes de ciclina (CDK) y su interacción con una familia de proteínas denominadas ciclinas controla la progresión a lo largo del ciclo celular eucariótico. La activación e inactivación coordinada de diferentes

complejos ciclina/CDK es necesaria para la progresión normal a lo largo del ciclo celular. Se están desarrollando varios inhibidores de la señalización del ciclo celular. Por ejemplo, se describen ejemplos de cinasas dependientes de ciclina, que incluyen CDK2, CDK4 y CDK6 e inhibidores de estas, por ejemplo, en Rosania G.R. y Chang Y.T., *Exp. Opin. Ther. Patents*, 10(2): 215-230 (2000). Además, p21WAF1/CIP1 se ha descrito como un inhibidor potente y universal de cinasas dependientes de ciclina (Cdk) (Ball K.L., *Prog. Ciclo Celular Res.*, 3: 125-134 (1997)). Los compuestos que se sabe que inducen la expresión de p21WAF1/CIP1 se han implicado en la supresión de la proliferación celular y tienen actividad supresora de tumores (Richon V.M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(18): 10014-10019 (2000)), y se incluyen como inhibidores de la señalización del ciclo celular. Los inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) están implicados en la activación transcripcional de p21WAF1/CIP1 (Vigushin D.M., and Coombes R.C., *Anticancer Drugs*, 13(1): 1-13 (2002)), y son inhibidores de la señalización del ciclo celular adecuados para usar en combinación en el presente documento. Los ejemplos de tales inhibidores de HDAC incluyen, a mero título enunciativo, vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico y mocetinostat.

Los inhibidores del proteasoma son fármacos que bloquean la acción de los proteasomas, complejos celulares que descomponen proteínas, como la proteína p53. Varios inhibidores del proteasoma se comercializan o están en estudio para el tratamiento del cáncer. Los inhibidores de proteasoma adecuados para usar en combinación en el presente documento incluyen, a mero título enunciativo, bortezomib, disulfiram, galato de epigallocatequina, salinosporamida A y carfilzomib.

Las proteínas de choque térmico de 70 kilodalton (Hsp70s) y las proteínas de choque térmico de 90 kilodalton (Hsp90s) son una familia de proteínas de choque térmico expresadas de forma ubicua. Hsp70s y Hsp90s están sobre expresados en ciertos tipos de cáncer. Se están estudiando varios inhibidores de Hsp70 y Hsp90 para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de inhibidores de Hsp70 y

Hsp90 para usar en combinación en el presente documento incluyen, a mero título enunciativo, tanespimicina y radicicol.

Muchas células tumorales muestran un metabolismo marcadamente diferente al de los tejidos normales. Por ejemplo, aumenta la tasa de glucólisis, el proceso metabólico que convierte la glucosa en piruvato, y el piruvato generado se reduce a lactato, en lugar de oxidarse más en las mitocondrias a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Este efecto se ve a menudo incluso en condiciones aeróbicas y se conoce como el Efecto Warburg.

La lactato deshidrogenasa A (LDH-A), una isoforma de la lactato deshidrogenasa expresada en las células musculares, juega un papel fundamental en el metabolismo de las células tumorales al realizar la reducción del piruvato a lactato, que luego puede exportarse fuera de la célula. Se ha demostrado que la enzima está regulada al alza en muchos tipos de tumores. La alteración del metabolismo de la glucosa descrita en el efecto Warburg es fundamental para el crecimiento y la proliferación de las células cancerosas y se ha demostrado que la eliminación de la LDH-A mediante el uso de RNA-i conduce a una reducción de la proliferación celular y el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjertos (Tennant DA, *et al.*, Nat. Rev. Cancer, 10(4): 267-277 (2010); Fantin V.R., *et al.*, Cancer Cell, 9(6): 425-434 (2006)).

Se han encontrado altos niveles de ácido graso sintasa (FAS) en lesiones precursoras del cáncer. La inhibición farmacológica de FAS afecta la expresión de oncogenes clave involucrados tanto en la evolución como en el mantenimiento del cáncer. Alli P.M., *et al.*, Oncogene, 24(1): 39-46 (2005).

Los inhibidores del metabolismo del cáncer, incluidos los inhibidores de LDH-A y los inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos (o inhibidores de FAS), son adecuados para usar en combinación en el presente documento.

La terapia génica del cáncer implica la transferencia selectiva de DNA/RNA recombinante utilizando vectores de administración de genes virales o no virales para modificar las llamadas de cáncer con fines terapéuticos. Los ejemplos de

terapia génica del cáncer incluyen, a mero título enunciativo, terapias génicas oncolíticas y suicidas, así como terapias de células T adoptivas.

Como se usa en el presente documento, "inmunomoduladores" se refiere a cualquier sustancia, incluidos los anticuerpos monoclonales, que afecta al sistema inmunitario. Un compuesto de la fórmula (I) o profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la invención puede considerarse un inmunomodulador. Los inmunomoduladores pueden usarse como agentes antineoplásicos para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, los inmunomoduladores incluyen, a mero título enunciativo, anticuerpos u otros antagonistas de CTLA-4, tales como ipilimumab (YERVOY®) y tremelimumab; PD-1, tales como dostarlimab, nivolumab (OPDIVO®), pembrolizumab (KEYTRUDA®) y cemiplimab (LIBTAYO®); y TIM-3, tal como cobolimab. Otros inmunomoduladores incluyen, a mero título enunciativo, anticuerpos u otros antagonistas de PD-L1, OX-40, LAG3, TIM-3, 41BB y GITR.

Como se usa en el presente documento, "antagonista de PD-1" significa cualquier compuesto químico o molécula biológica que bloquea la unión de PD-L1 expresado en una célula cancerosa a PD-1 expresado en una célula inmunitaria (célula T, célula B o célula NKT) y preferiblemente también bloquea la unión de PD-L2 expresada en una célula cancerosa al PD-1 expresado en células inmunitarias. Los nombres alternativos o sinónimos de PD-1 y sus ligandos incluyen: PDCD1, PD1, CD279 and SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 y B7-H for PD-L1; y PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc y CD273 para PD-L2. Las secuencias de aminoácidos de PD-1 humana se pueden encontrar en NCBI Locus n.º: NP_005009. Las secuencias de aminoácidos de PD-L1 y PD-L2 humanas se pueden encontrar en NCBI Locus n.º: NP_054862 y NP_079515, respectivamente.

Los antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los aspectos de la invención incluyen un anticuerpo monoclonal (mAb), o un fragmento de unión a antígeno de este, que se une específicamente a PD-1 o PD-L1, y preferiblemente se une específicamente a PD-1 humano o PD-L1 humano. El mAb puede ser un

anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico y puede incluir una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en realizaciones preferidas, la región constante humana es una región constante IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv y Fv.

Ejemplos de mAbs que se unen a PD-1 humana, y útiles en los diversos aspectos y realizaciones de la invención, se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 8,552,154; Patente de los Estados Unidos n.º 8,354,509; Patente de los Estados Unidos n.º 8,168,757; Patente de los Estados Unidos n.º 8,008,449; Patente de EE.UU. n.º 7,521,051; Patente de EE. UU. n.º 7,488,802; WO2004072286; WO2004056875; y WO2004004771.

Otros antagonistas de PD-1 útiles en cualquiera de los aspectos y realizaciones de la invención incluyen una inmunoadhesina que se une específicamente a PD-1, y preferiblemente se une específicamente a PD-1 humana, por ejemplo, una proteína de fusión que contiene la porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante tal como una región Fc de una molécula de inmunoglobulina. En los documentos WO2010027827 y WO2011066342 se describen ejemplos de moléculas de inmunoadhesina que se unen específicamente a PD-1. Las proteínas de fusión específicas útiles como antagonista de PD-1 en el método de tratamiento, los medicamentos y los usos de la invención incluyen AMP-224 (también conocido como B7-DCIg), que es una proteína de fusión de PD-L2-FC y se une a PD-1.

Nivolumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-1 disponible comercialmente como OPDIVO®. Nivolumab está indicado para el tratamiento de algunos melanomas irresecables o metastásicos. Nivolumab se une y bloquea la activación de PD-1, una proteína transmembranaria de la superfamilia de Ig, por sus ligandos PD-L1 y PD-L2, lo que da como resultado la activación de células T y respuestas inmunitarias mediadas por células contra células

tumorales o patógenos. El PD-1 activado regula negativamente la activación de las células T y la función efectora a través de la supresión de la activación de la vía P13k/Akt. Otros nombres para nivolumab incluyen: BMS-936558, MDX-1106 y ONO-4538. La secuencia de aminoácidos para nivolumab y los métodos de uso y preparación se describen en la Patente de EE. UU. n.º US 8,008,449.

Pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-1 disponible comercialmente como KEYTRUDA®. Pembrolizumab está indicado para el tratamiento de algunos melanomas irresecables o metastásicos. La secuencia de aminoácidos de pembrolizumab y los métodos de uso se describen en la Patente de EE.UU. n.º 8,168,757.

Los anticuerpos anti-PD-L1 y los métodos para prepararlos son conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos contra PD-L1 pueden ser policlonales o monoclonales y/o recombinantes y/o humanizados. Los anticuerpos PD-L1 están en evolución como agentes inmunomoduladores para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos PD-L1 ejemplares se describen en la Patente de EE.UU. n.º 9,212,224; Patente de EE.UU. n.º 8,779,108; Patente de EE.UU. n.º 8,552,154; Patente de los Estados Unidos n.º 8,383,796; Patente de los Estados Unidos n.º 8,217,149; publicación de patente estadounidense n.º 20110280877; WO2013079174; y WO2013019906. Anticuerpos ejemplares adicionales para PD-L1 (también denominados CD274 o B7-H1) y métodos para su uso se describen en la Patente de EE.UU. n.º 8,168,179; Patente de los Estados Unidos n.º 7,943,743; Patente de los Estados Unidos n.º 7,595,048; WO2014055897; WO2013019906; y WO2010077634. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 humanos específicos útiles como antagonistas de PD-1 en el método de tratamiento, medicamentos y usos de la invención incluyen MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C.

Atezolizumab es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 completamente humanizado disponible comercialmente como TECENTRIQ®. Atezolizumab está indicado para el tratamiento de algunos carcinomas uroteliales metastásicos o localmente avanzados. Atezolizumab bloquea la interacción de PD-L1 con PD-1

y CD80. Otros ejemplos de anticuerpos PD-L1 incluyen avelumab (BAVENCIO®) y durvalumab (IMFINZI®).

Las proteínas de fusión bifuncionales que se dirigen a PD-1 o PD-L1 junto con otro objetivo también pueden ser útiles con la invención. Bintrafusp alfa, una proteína de fusión bifuncional diseñada para bloquear simultáneamente las rutas de PD-L1 y TGF- β , se describe en la patente de EE. UU. n.º 9,676,863.

CD134, también conocido como OX40, es un miembro de la superfamilia de receptores TNFR que no se expresa constitutivamente en las células T vírgenes en reposo, a diferencia de CD28. OX40 es una molécula coestimuladora secundaria, expresada después de 24 a 72 horas después de la activación; su ligando, OX40L, tampoco se expresa en células presentadoras de antígeno en reposo, sino que sigue a su activación. La expresión de OX40 depende de la activación completa de la célula T; sin CD28, la expresión de OX40 se retrasa y es cuatro veces menor. Los anticuerpos OX-40, las proteínas de fusión OX-40 y los métodos para usarlos se describen en las patentes de EE. UU. n.º: US 7,504,101; US 7,758,852; US 7,858,765; US 7,550,140; US 7,960,515; WO2012027328; WO2013028231.

Otros ejemplos de un ingrediente o ingredientes activos adicionales (agente antineoplásico) para uso en combinación o administración conjunta con los compuestos de la divulgación son anticuerpos u otros antagonistas de CD20, retinoides u otros inhibidores de cinasa. Los ejemplos de dichos anticuerpos o antagonistas incluyen, a mero título enunciativo, rituximab (RITUXAN® y MABTHERA®), ofatumumab (ARZERRA®) y bexaroteno (TARGRETIN®).

Otros ejemplos de un ingrediente o ingredientes activos adicionales (agente antineoplásico) para usar en combinación o coadministrarse con los compuestos de la divulgación son los antagonistas del receptor tipo Toll 4 (TLR4), que incluyen, a mero título enunciativo, aminoalquil glucosaminida fosfatos (AGP).

Se sabe que los AGP son útiles como adyuvantes de vacunas y agentes inmunoestimuladores para estimular la producción de citocinas, activar macrófagos, promover la respuesta inmunitaria innata y aumentar la producción

de anticuerpos en animales inmunizados. Los AGP son ligandos sintéticos de TLR4. Los AGP y sus efectos inmunomoduladores a través de TLR4 se describen en publicaciones de patentes como WO 2006016997, WO 2001090129 y/o Patente de EE. UU. n.º 6,113,918 y se han informado en la bibliografía. Otros derivados de AGP se describen en la Patente de EE. UU. n.º 7,129,219, la Patente de EE. UU. n.º 6,911,434 y la Patente de EE. UU. n.º 6,525,028. Ciertos AGP actúan como agonistas de TLR4, mientras que otros se reconocen como antagonistas de TLR4.

Otros ejemplos no limitantes adicionales de un ingrediente o ingredientes activos adicionales (agente antineoplásico) para uso en combinación o administración conjunta con los compuestos de la divulgación son anticuerpos contra ICOS.

Las CDR para anticuerpos murinos contra ICOS humanos que tienen actividad agonista se muestran en PCT/EP2012/055735 (WO 2012131004). Los anticuerpos contra ICOS también se describen en los documentos WO 2008137915, WO 2010056804, EP 1374902, EP1374901 y EP1125585.

Ejemplos adicionales de un ingrediente o ingredientes activos adicionales (agente antineoplásico) para uso en combinación o administración conjunta con los compuestos de la divulgación son los inhibidores de poli ADP ribosa polimerasa (PARP). Los ejemplos no limitantes de dichos inhibidores incluyen niraparib, olaparib, rucaparib y talazoparib.

La función normal del antígeno de maduración de células B (BCMA) es promover la supervivencia celular mediante la transducción de señales de dos ligandos conocidos (factor activador de células B de la familia TNF (BAFF/BLyS) y un ligando inductor de proliferación (APRIL). La expresión de BCMA está restringida a las células B en etapas posteriores de diferenciación, con expresión en las células B del centro germinal en las amígdalas, blastos de plasma sanguíneo y células plasmáticas de larga vida. La BCMA se expresa en diversas neoplasias malignas de células B, incluido el mieloma múltiple (MM), el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), el linfoma de células B grandes (LBCL), la leucemia linfocítica crónica (CLL) y la macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) en

distintas frecuencias. El perfil restringido de expresión tisular normal de BCMA, junto con su función de sobreexpresión y supervivencia en MM y otros cánceres, lo convierte en un objetivo atractivo para un anticuerpo terapéutico con actividad directa para matar células. Con la invención pueden usarse inhibidores de BCMA y otros agentes dirigidos, tales como conjugados de anticuerpo y fármaco. Belantamab mafodotina, un conjugado de fármaco de anticuerpo anti-BCMA, se describe en la Patente de EE.UU. n.º 9,273,141.

Otros ejemplos no limitantes de otro ingrediente activo (agente antineoplásico) para usar en combinación o coadministrados con los compuestos de la divulgación son compuestos moduladores de STING, inhibidores de CD39 y antagonistas de adenosina A2a y A2a.

Los agentes antineoplásicos seleccionados que se pueden usar en combinación con un compuesto de la fórmula (I) o un profármaco de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, incluyen, a mero título enunciativo: abarelix, abemaciclib, abiraterona, afatinib, aflibercept, aldoxorrubicina, alectinib, alemtuzumab, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, AZD-9291, belinostat, bendamustina, bevacizumab, blinatumomab, bosutinib, brentuximab vedotin, cabazitaxel, cabozantinib, capecitabina, ceritinib, clofarabina, cobimetinib, crizotinib, daratumumab, dasatinib, degarelix, denosumab, dinutuximab, docetaxel, elotuzumab, entinostat, enzalutamida, epirubicina, eribulina, filgrastim, flumatinib, fulvestrant, fruquintinib, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab, ibrutinib, idelalisib, imatinib, irinotecán, ixabepilona, ixazomib, lenalidomida, lenvatinib, leucovorina, mecloretamina, necitumumab, nelarabina, netupitant, nilotinib, obinutuzumab, olaparib, omacetaxina, osimertinib, oxaliplatino, paclitaxel, palbociclib, palonosetron, panitumumab, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2b, pemetrexed, plerixafor, pomalidomida, ponatinib, pralatrexato, quizartinib, radio-223, ramucirumab, regorafenib, rolapitant, rucaparib, sipuleucel-T, sonidegib, sunitinib, talimogene laherparepvec, tipiracil, topotecan, trabectedina, trifluridina, triptorelina, uridina, vandetanib, velaparib,

vemurafenib, venetoclax, vincristina, vismodegib y ácido zoledrónico. Los agentes antineoplásicos preferidos incluyen venetoclax.

Los agentes preferidos incluyen agentes dirigidos a BCL2 tales como venetoclax, inhibidores de tirosina cinasa tales como los dirigidos a mutaciones FLT3 (gilteritinib y midostaurina), el inhibidor sonic hedgehog glasdegib, agentes dirigidos a mutantes IDH1 o IDH2 tales como ivosidenib o enasidenib, agentes dirigidos a NEDD8 tales como pevonedistat, inhibidores de HDAC tales como vorinostat o panobinostat, agentes dirigidos al complejo PRC2 tales como tazemetostat (EZH2i) o MAK683 (EEDi), agentes antineoplásicos con platino tales como cisplatino, agentes dirigidos a IO tales como anti-CD47 (magrolimab), TIM-3 (sabatolimab), CTLA-4 (ipilimumab) y anti-PD-1/PD-L1 (pembrolizumab), así como fármacos dirigidos a P53.

En una realización, el método de tratamiento del cáncer de la invención reivindicada incluye la coadministración de un compuesto de la Fórmula (I) y/o un profármaco de este y/o una sal farmacéuticamente aceptable de este y al menos un agente antineoplásico, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en agentes antimicrotúbulos, complejos de coordinación de platino, agentes alquilantes, agentes antibióticos, inhibidores de la topoisomerasa II, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa I, hormonas y análogos hormonales, inhibidores de la vía de transducción de señales, inhibidores de la angiogénesis de la tirosina cinasa no receptora, inmunoterapéuticos agentes, agentes proapoptóticos, inhibidores de la señalización del ciclo celular; inhibidores de proteasomas; e inhibidores del metabolismo del cáncer.

Los compuestos de la fórmula (I) o profármacos de estos, y las sales farmacéuticamente aceptables de estos, se pueden coadministrar con al menos otro agente activo que se sabe que es útil para tratar las beta hemoglobinopatías, tales como la enfermedad de células falciformes, la anemia de células falciformes y beta talasemia

Los ejemplos de otro ingrediente o ingredientes activos adicionales para usar en combinación o coadministrarse con las combinaciones de la invención es la hidroxiiurea.

Los compuestos de la invención se preparan usando métodos sintéticos orgánicos convencionales. En los siguientes esquemas generales de reacción se representan vías sintéticas adecuadas. Todos los materiales de partida están disponibles comercialmente o los expertos en la técnica los preparan fácilmente a partir de materiales de partida disponibles comercialmente.

Como se usan en el presente documento, los símbolos y convenciones usados en estos procesos, esquemas y ejemplos son consistentes con los usados en la literatura científica contemporánea, por ejemplo, el *Journal of the American Chemical Society* o el *Journal of Biological Chemistry*. Las abreviaturas estándar de una o tres letras se utilizan generalmente para designar residuos de aminoácidos, que se supone que están en configuración L a menos que se indique lo contrario. A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional. Específicamente, las siguientes abreviaturas pueden usarse en los ejemplos y en toda la memoria:

Ac (acetilo);

Ac₂O (anhídrido acético);

CH₃CN (acetonitrilo);

Boc (*tert*-butoxicarbonilo);

Boc₂O (dicarbonato de di-*tert*-butilo);

Cbz (benciloxycarbonilo);

DCE (1,2-dicloroetano);

DCM (diclorometano);

ATP (trifosfato de adenosina);

Bis-pinacolatodiboro (4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolano);

BSA (seroalbúmina bovina);

C18 (hace referencia a grupos alquilo de 18 carbonos sobre silicona en fase estacionaria de HPLC)
 Cy (ciclohexilo);
 DCM (diclorometano);
 DIEA (diisopropiletilamina);
 DIPEA (base de Hünig, *N*-etil-*N*-(1-metiletil)-2-propanamina);
 Dioxano (1,4-dioxano);
 DMAP (4-dimetilaminopiridina);
 DME (1,2-dimetoxietano);
 DMEDA (*N,N'*-dimetiletilendiamina);
 DMF (*N,N*-dimetilformamida);
 DMSO (sulfóxido de dimetilo);
 DPPA (difenilfosforilazida);
 EDC (hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*etilcarbodiimida);
 EDTA (ácido etilendiaminotetraacético);
 EtOAc (acetato de etilo);
 EtOH (etanol);
 Et₂O (dietiléter);
 HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil etanosulfónico);
 HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio);
 HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol);
 HOBt (1-hidroxibenzotriazol);
 HOAc (ácido acético);
 HPLC (cromatografía de líquidos de alta presión);
 HMDS (hexametildisilazida);
 Base de Hünig (*N,N*-diisopropiletilamina);
 IPA (alcohol isopropílico);
 Indolina (2,3-dihidro-1*H*-indol);
 KHMDS (hexametildisilazida de potasio);

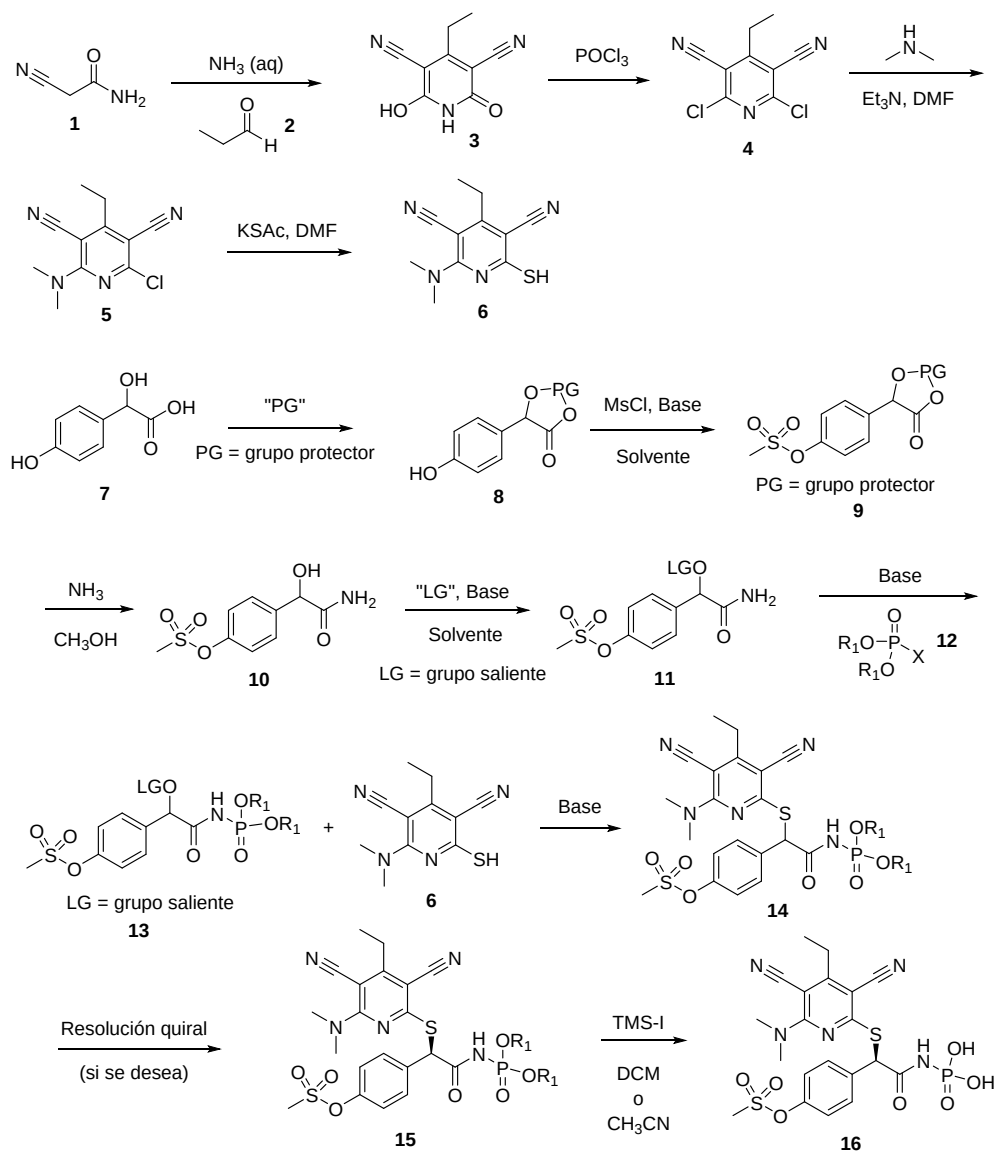
LAH (hidruro de aluminio y litio);
 LDA (diisopropilamida de litio);
 LHMDs (hexametildisilazida de litio);
 MeOH (metanol);
 MTBE (*tert*-butilmetiléter);
 mM (micromolar);
 mCPBA (ácido m-cloroperbenzoico);
 NaHMDS (hexametildisilazida de sodio);
 NCS (N-clorosuccinimida);
 NBS (*N*-bromosuccinimida);
 PE (éter de petróleo);
 Pd₂(dba)₃ (tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0));
 Complejo Pd(dppf)Cl₂.DCM (complejo de
 [1,1'-bis(difenilfosfano)ferroceno]dicloropaladio(II).diclorometano);
 PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio);
 PyBrOP (hexafluorofosfato de bromotripirrolidinofosfonio);
 RPHPLC (cromatografía de líquidos de alta presión en fase inversa);
 RT (temperatura ambiente);
 Sat. (saturado);
 SFC (cromatografía de fluidos supercríticos);
 SGC (cromatografía en gel de sílice);
 SM (material de partida);
 TLC (cromatografía de capa fina);
 TEA (triethylamina);
 TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidinil 1-óxido, radical libre);
 TFA (ácido trifluoroacético);
 THF (tetrahidrofurano), y
 Ts-Cl (cloruro de p-toluensulfonilo).
 Todas las referencias a “éter” significan dietiléter y “salmuera” se refiere a
 solución acuosa saturada de NaCl.

Esquemas de síntesis

El experto apreciará que si un sustituyente descrito en el presente documento no es compatible con los métodos de síntesis descritos en el presente documento, el sustituyente puede protegerse con un grupo protector adecuado que sea estable frente a las condiciones de reacción. El grupo protector puede retirarse en un momento adecuado de la secuencia de reacción para obtener un compuesto intermedio u objetivo deseados. Los grupos protectores y métodos adecuados para proteger y desproteger diferentes sustituyentes utilizando grupos protectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica; sus ejemplos pueden encontrarse en T. Greene & P. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis (4th ed.), John Wiley & Sons, NY (2006). En ciertas instancias, un sustituyente puede seleccionarse específicamente para ser reactivo en las condiciones de reacción usadas. En estas circunstancias, las condiciones de reacción convierten el sustituyente seleccionado en otro sustituyente que es útil como compuesto intermedio o es un sustituyente deseado en un compuesto objetivo.

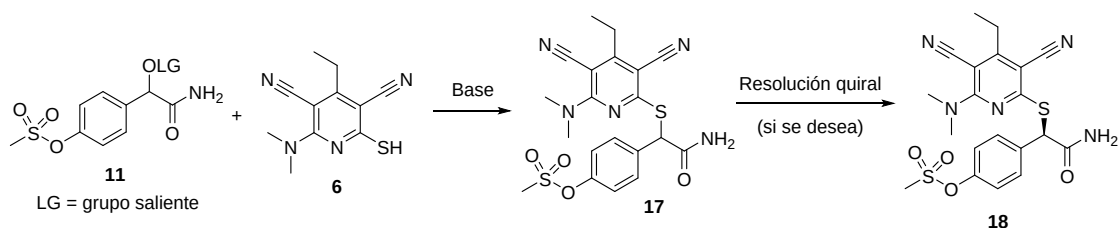
Los profármacos de la fórmula **16** en el Esquema 1 pueden ser un enantiómero simple o un racemato, dependiendo de que se realice una resolución quirál. El producto intermedio con centro de dicianopiridina **6** puede prepararse fácilmente a partir de 2-cianoacetamida **1**. El producto intermedio que contiene al profármaco puede prepararse empezando desde un ácido mandélico sustituido, tal como el ácido 4-hidroximandélico, disponible en forma comercial **7**. Es posible imaginar que uno o más de una serie de casos de grupos protectores, además de grupos salientes, permitirían la conversión de **7** al compañero electrófilo S_N2 **13**.

Esquema 1



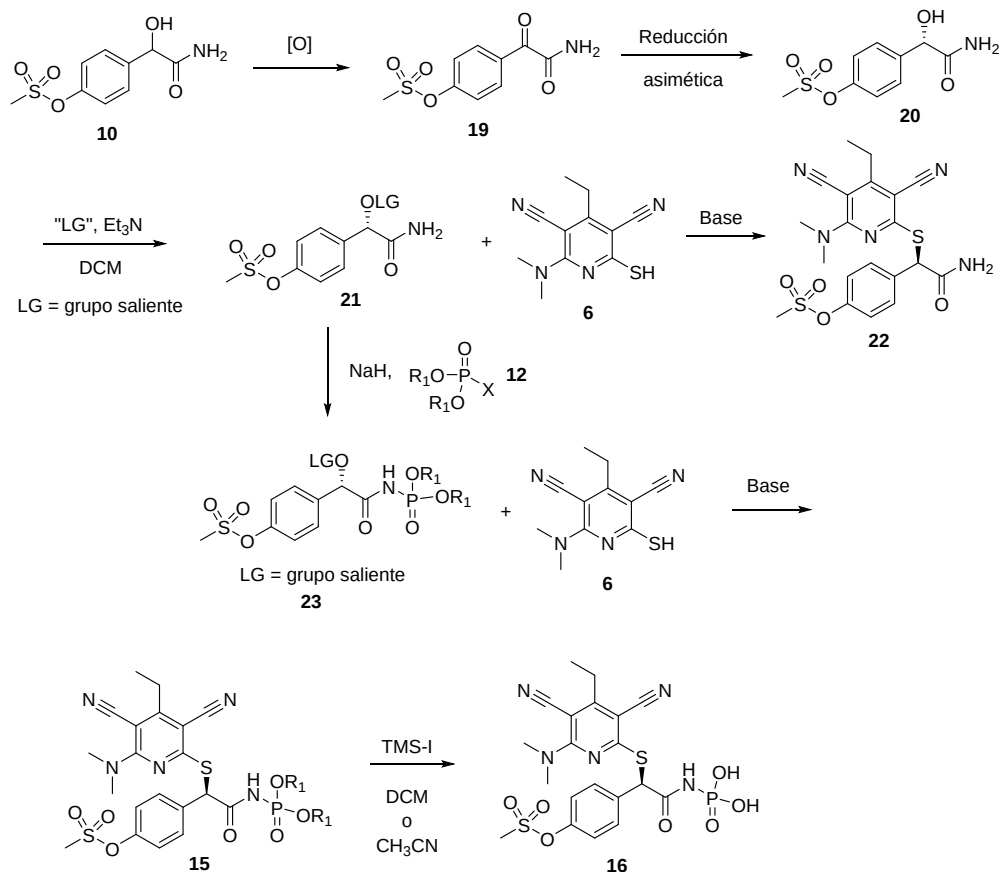
Los compuestos con funcionalidad de profármaco, tales como **17**, pueden prepararse a partir del producto intermedio **11**, como se muestra en el Esquema 2. En esta etapa, **17** puede resolverse, si se desea, para obtener el enantiómero simple **18**.

Esquema 2



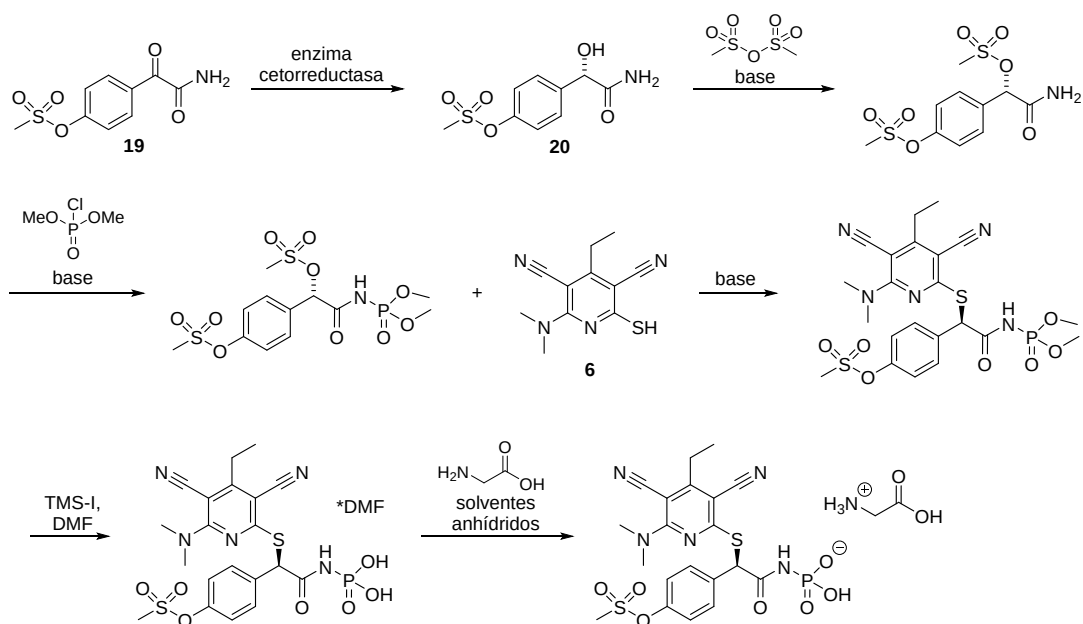
En lugar de una resolución quiral, puede utilizarse una vía asimétrica para obtener la amida quiral **22** o su contraparte, el profármaco **16**, como se detalla en el Esquema 3. El estereocentro aislado puede establecerse mediante un reducción asimétrica del producto intermedio, la cetoamida **19**, a través de uno o más de una serie de métodos según se describe en la bibliografía.

Esquema 3



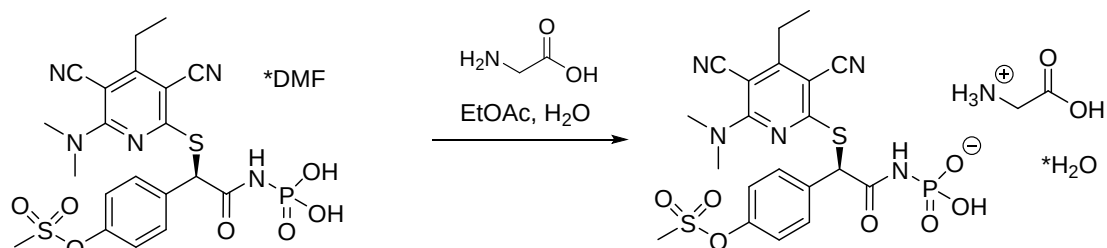
Esquema 4

Síntesis asimétrica de la sal de glicina



Esquema 5

Síntesis asimétrica del monohidrato de la sal de glicina



Los compuestos específicos de la invención se preparan en la sección de Ejemplos.

EJEMPLOS

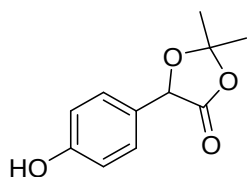
Ejemplo 1

Método A

Ácido

(R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico

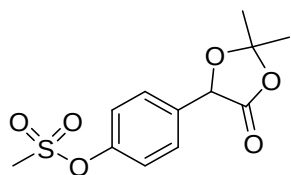
Paso 1: 5-(4-hidroxifenil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ona



Se cargó un JLR de 16 L (reactor A) con ácido 2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)acético (1000 g, 5,947 mol) junto con diclorometano (DCM) (5000 mL) y se comenzó a agitar. Luego se agregó 2,2-dimetoxipropano (2925 mL, 23,8 mol) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Cuando la temperatura de la reacción alcanzó 0-5 °C, se agregó complejo $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (45,2 mL, 0,357 mol) por medio de una pipeta durante 2 min. Se usó DCM para completar el agregado. Luego, la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 4 horas.

En un reactor separado (reactor B) se agregaron 5 L de solución acuosa saturada de NaHCO_3 y la temperatura interna del reactor se estableció en 0 °C. La mezcla de reacción del reactor A se agregó a la solución saturada de bicarbonato de sodio en el reactor B por medio de una transferencia al vacío. Una vez completado el agregado, la suspensión se agitó durante 10 minutos y luego se llevó a 20 °C. La capa orgánica se separó en una damajuana de 20 L. La capa acuosa se extrajo con DCM adicional (1,2 L) y esta capa orgánica se combinó con la capa orgánica de la damajuana de 20 L. Las capas orgánicas combinadas se volvieron a colocar en el JLR y se lavaron con salmuera (3 L). La capa orgánica se separó una vez más. Al día siguiente, el DCM se destiló a un volumen de agitación mínimo. La mezcla de reacción restante se concentró a sequedad en un evaporador rotativo. El sólido blancuzco que quedaba se secó al vacío para obtener 5-(4-hidroxifenil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ona (720 g, 58,1% rendimiento) en la forma de un sólido blancuzco. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,28 - 7,24 (m, 2H), 6,83 - 6,78 (m, 2H), 5,37 (s, 1H), 1,75 (s, 3H), 1,70 - 1,67 (m, 3H).

Paso 2: Metanosulfonato de 4-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-il)fenilo

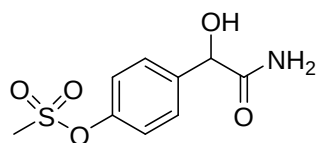


Se cargó un JLR de 16 L (reactor A) con una solución de 5-(4-hidroxifenil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ona (720,0 g, 3458 mmol) disuelta en diclorometano (DCM) (4390 mL) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Luego se agregó cloruro de mesilo (323 mL, 4150 mmol) a la mezcla de reacción a través de un embudo durante aprox. 5 min; la transferencia se completó al enjuagar el embudo con 100 mL DCM en el reactor. Se agregó trietilamina (723 mL, 5187 mmol) lentamente durante unos 43 min utilizando un embudo; la transferencia se completó enjuagando el embudo con 100 mL de DCM en el reactor. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 horas.

En un reactor separado (reactor B) se agregaron 4390 mL de solución acuosa saturada de NaHCO₃ y la temperatura interna del reactor se estableció en 0 °C. El reactor B se llevó a presión reducida para facilitar la transferencia lenta al vacío de la mezcla de reacción del reactor A al reactor B. El reactor A se enjuagó con 300 mL de DCM y esta solución de lavado también se transfirió al reactor B. La agitación se detuvo y se agregaron 500 mL de agua DI al reactor B por medio de una esfera pulverizadora para lavar las paredes del reactor. Se reinició la agitación y la temperatura interna se estableció en 20 °C. La agitación se detuvo después de 30 min y se dejó reposar la mezcla bifásica toda una noche a 20 °C. La temperatura interna se estableció en 10 °C y el reactor se colocó en el vacío. Después de 30 minutos, la temperatura interna se elevó a 25 °C. Durante la 1,5 hora siguiente, el volumen se redujo entre 1,5 L y 2 L, y se liberó el vacío. La capa orgánica del reactor B se drenó y el reactor se enjuagó con DCM para completar la transferencia. La capa orgánica remanente se concentró a sequedad en un evaporador rotativo y se secó adicionalmente en alto vacío para obtener metanosulfonato de 4-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-il)fenilo (689,67 g, 69,7% rendimiento) en la forma de un sólido blancuzco. LCMS

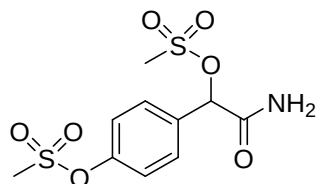
$m/z = 304,2 [M+H_2O]^+$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,61 - 7,56 (m, 2H), 7,39 - 7,35 (m, 2H), 5,44 (s, 1H), 3,18 (s, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,72 (s, 3H).

Paso 3: Metanosulfonato de 4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo



Se cargó un JLR de 16 L con metanosulfonato de 4-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-il)fenilo (689,67 g, 2409 mmol) junto con metanol (2400 mL) y la solución se agitó. La temperatura de la camisa se estableció en 0 °C. A la mezcla de reacción se le agregó una solución de amoníaco en MeOH (7 M) (1377 mL, 9636 mmol) durante 47 minutos. Después de agitar la mezcla de reacción a la misma temperatura durante 7,5 horas, la temperatura de la camisa se elevó a 10 °C. Se agregaron 250 mL adicionales (1750 mmol) de amoníaco 7 M en metanol y la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 16,5 horas. Luego, La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de bandeja. El sólido recolectado se lavó con metanol adicional y se secó para obtener metanosulfonato de 4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo (544,86 g, 92% rendimiento) en la forma de un sólido blanco. LCMS $m/z = 268,1 [M+Na]^+$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 7,64 - 7,54 (m, 3H), 7,40 - 7,32 (m, 3H), 6,29 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,03 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 3,38 (s, 3H).

Paso 4: Metanosulfonato de 4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo



Se cargó un JLR de 16 L (reactor A) con metanosulfonato de 4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo (545 g, 2222 mmol) y diclorometano (DCM) (4331 mL). La agitación comenzó y la temperatura de la camisa se estableció en 0 °C. Tras 25 minutos, se agregó cloruro de mesilo (216 mL, 2778 mmol) a la

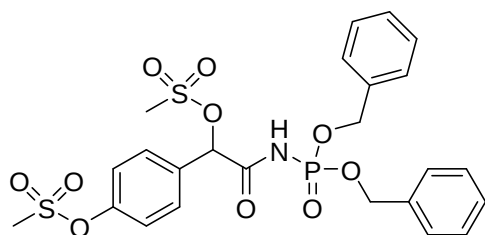
mezcla de reacción. Luego se agregó trietilamina (465 mL, 3333 mmol) lentamente a través de un embudo durante 35 minutos. Tras completar el agregado, la temperatura de la camisa se elevó a 20 °C durante 40 minutos. La mezcla de reacción se dejó en agitación a la misma temperatura durante 19 horas, pero el material de partida se mantuvo. La temperatura de la camisa se ajustó a 0 °C. Se agregó cloruro de mesilo adicional (30 mL, 385,8 mmol) a la mezcla de reacción, junto con 70 mL de DCM para completar el agregado. Luego se agregó una cantidad adicional de trietilamina (70 mL, 501,7 mmol). Tras completar el agregado, la temperatura de la camisa se estableció en 22 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora.

Un reactor separado (reactor B) se cargó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (2166 mL) y la temperatura de la camisa se estableció en 0 °C. La mezcla de reacción del reactor A se transfirió por vacío al reactor B a una velocidad que permitiera controlar la exotermia y la evolución de gases. Tras completar la transferencia, la temperatura de la camisa se elevó a 20 °C durante 30 minutos y la mezcla de reacción se agitó a esta temperatura durante otros 30 minutos. Luego, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de bandeja. El material sólido recolectado se lavó con agua (550 mL) y se secó al vacío en el filtro de bandeja toda una noche. El sólido se secó adicionalmente en un horno de vacío a 45 °C toda una noche para obtener metanosulfonato de 4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (530,36 g, 73,8% rendimiento) en la forma de un sólido blanco. LCMS $m/z = 346,1$ $[M+Na]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,88 (s, 1H), 7,63 - 7,58 (m, 2H), 7,45 - 7,41 (m, 2H), 5,92 (s, 1H), 3,42 (s, 3H), 3,27 (s, 3H).

Paso 5:Metanosulfonato

de

4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo



Se cargó un JLR de 16 L (reactor A), con una temperatura interna establecida en -5 °C, con 8 L de tetrahidrofurano (THF) y se comenzó a agitar. El reactor luego se cargó con hidruro de sodio (60% en peso) (203,45 g, 5,087 mol) a través de un embudo para polvos. El recipiente y el embudo se enjuagaron con 1 L de THF en el reactor para completar la transferencia. A la mezcla de reacción se le agregó pirofosfato de tetrabencilo (1471 g, 2,732 mol) a través de un embudo para polvos. El recipiente y el embudo se enjuagaron con 0,5 L de THF en el reactor para completar la transferencia. La temperatura de reacción se estableció en -3 °C y se agregaron 2,5 L adicionales de THF a la mezcla de reacción. A la mezcla de reacción se le agregó metanosulfonato de 4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (736 g, 2,276 mol) en 7 partes durante 30 minutos, ventilando la mezcla de reacción entre agregados. El agregado se completó enjuagando el recipiente de dimesilato con THF adicional (3 L) llevando a 15 L el total de THF en el reactor. Se aumentó la agitación a 300 rpm y la camisa de reacción se calentó a 25 °C durante 30 minutos. Luego, la mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2 horas.

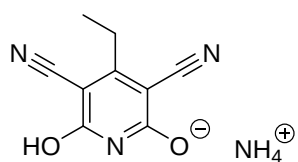
La reacción se desactivó en 2 porciones. A un reactor separado (reactor B) con su temperatura interna establecida en 0 °C, se le agregaron 6 L de solución saturada de ácido cítrico. A esta solución en el reactor B se le agregaron 8,5 L de la mezcla de reacción del reactor A durante 30 minutos. Durante el agregado, la temperatura de la camisa del reactor B se ajustó a -15 °C. Tras completar el agregado, la temperatura de la camisa del reactor B se elevó a 10 °C. Tras agitar durante 1 hora a 10 °C, la mezcla se filtró a través de un filtro de bandeja (se usaron dos papeles de filtro grado Shark Skin). Una vez evacuado por completo el reactor B, se lo cargó por segunda vez con 6 L de una solución saturada de

ácido cítrico y la temperatura se ajustó a -15 °C. El procedimiento de desactivación se repitió mediante el agregado del resto de la mezcla de reacción del reactor A al reactor B durante 35 minutos. La temperatura del reactor B se volvió a ajustar a 10 °C. El reactor A se enjuagó con 500 mL de THF y este enjuague se agregó al reactor B. La temperatura de la camisa del reactor B se ajustó a 25 °C y la mezcla se mantuvo a la misma temperatura durante 25 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través del mismo filtro de bandeja que se usó anteriormente. Se agregó *tert*-butilmetiléter (TBME) al filtro de bandeja para auxiliar la filtración, pero esto prácticamente no implicó mejora alguna. Después de 50 minutos, el material del filtro de bandeja se transfirió de nuevo al reactor por medio de una transferencia al vacío. Se agregó TBME (8 L) al reactor y la mezcla se volvió a filtrar a través de un filtro de bandeja. A medida que la filtración avanzaba, la mezcla de sólidos se convirtió en una pasta y fue necesario raspar para facilitar el proceso. Después de 1,5 hora, todos los contenidos del reactor se habían agregado al filtro de bandeja y el reactor se enjuagó con 1,5 L adicional de TBME. Este enjuague se agregó al filtro de bandeja y se dejó filtrar toda una noche. Tras filtrar al vacío toda una noche, el sólido aislado se transfirió a las bandejas de secado de vidrio. Las bandejas se colocaron en un horno de vacío a 25 °C toda una noche.

Tras secar toda una noche en el horno de vacío, el material sólido se transfirió a un balón de 3 cuellos de 12 L y se suspendió en 8 L de agua. La mezcla se mezcló vigorosamente durante 1 hora utilizando un agitador mecánico superior, luego se filtró a través de un filtro de bandeja de acero inoxidable equipado con tres capas de papel de filtro grado Shark Skin. Se usaron 2 L de agua adicionales para completar la transferencia. El residuo del filtro se lavó dos veces con 2 L de agua seguidos por 4 L de TBME. Luego, el sólido se secó al vacío toda una noche en el filtro de bandeja. El sólido se transfirió del filtro de bandeja a dos fuentes y se lo secó adicionalmente en un horno de vacío con purga de nitrógeno, sin calentar, durante 48 horas. El sólido se combinó para obtener metanosulfonato de

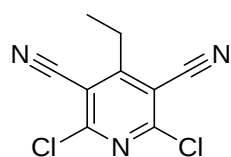
4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (1060 g, 80%) en la forma de un sólido blanco. LCMS $m/z = 584,3$ $[M+H]^+$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 10,51 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), 7,67 - 7,61 (m, 2H), 7,48 - 7,43 (m, 2H), 7,41 - 7,31 (m, 8H), 7,28 - 7,23 (m, 2H), 6,11 (s, 1H), 5,10 - 4,85 (m, 4H), 3,41 (s, 3H), 3,29 (s, 3H).

Paso 6: 3,5-diciano-4-etil-6-hidroxipiridin-2-olato de amonio



A una solución agitada de 2-cianoacetamida (300 g, 3,571 mol) y amoníaco (25% en peso en agua, 618 mL, 7,142 mol) en agua (750 mL) enfriada a 0 °C se le agregó propionaldehído (128 mL, 1,785 mol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua helada (2 × 500 mL) seguida de metanol frío (300 mL) y se secó para obtener 3,5-diciano-4-etil-6-hidroxipiridin-2-olato de amonio (150 g, 39%) en la forma de un sólido blancuzco. LCMS $m/z = 188,0$ $[M-H]^-$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 10,35 (s, 1H), 7,1 (br s, 4H), 2,48 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,17 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

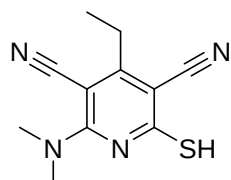
Paso 7: 2,6-dicloro-4-etilpiridin-3,5-dicarbonitrilo



A una suspensión agitada de 3,5-diciano-4-etil-6-hidroxipiridin-2-olato de amonio (150 g, 697 mmol) en POCl_3 (750 mL, 8046 mmol) enfriada a 0 °C se le agregó N,N -dimetilanilina (150 mL, 1601 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se calentó a 120 °C durante 6 horas. El progreso de la reacción se controló mediante TLC (sistema TLC, EtOAc al 10% en hexano, R_f : 0,6, detección: UV). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener el material en bruto. El material en bruto se diluyó con agua helada y se agitó durante

10 min. El sólido precipitado se recolectó mediante filtración y se secó. El sólido se disolvió en diclorometano (2 L), se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (1 L), agua (1,5 L) y solución de salmuera (1 L). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener un sólido amarillo. El material sólido se trituró con dietiléter (500 mL), se filtró y se secó para obtener 2,6-dicloro-4-etilpiridin-3,5-dicarbonitrilo (130 g, 571 mmol, 82% rendimiento) en la forma de un sólido amarillo. LCMS m/z = 224,1 [M-H]⁻. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3,13 (q, J = 7,6 Hz, 2H), 1,42 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

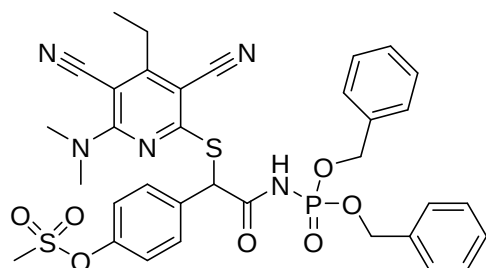
Paso 8: 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo



Un balón de 3 cuellos de 3 L con agitación superior y sonda de temperatura se cargó con 2,6-dicloro-4-etilpiridin-3,5-dicarbonitrilo (130,0 g, 575 mmol) y DMF (1300 mL) y se agitó hasta formar una solución rojiza. El matraz de la reacción se colocó en un baño de hielo y la solución se agitó hasta que la temperatura interna alcanzó aproximadamente 3 °C. Se agregó una solución de dimetilamina en THF (288 mL, 575 mmol) por medio de un embudo a una velocidad tal que la temperatura interna se mantuviera por debajo de 5 °C. Se agregó trietilamina (80 mL, 575 mmol) gota a gota manteniendo la temperatura interna por debajo de 7 °C. La mezcla tomó un color púrpura oscuro hacia el final del agregado de trietilamina. Se agregó tioacetato de potasio (164 g, 1438 mmol) y se retiró el baño de enfriamiento. La mezcla se agitó a RT durante 2 h y se vertió en una mezcla de solución de HCl 1 N frío (1150 mL, 1150 mmol) y agua (2600 mL). La mezcla se agitó alrededor de 30 min y los sólidos precipitados se recolectaron por filtración. El residuo del filtro se lavó con varias partes de agua (1 L en total) y se secó toda una noche en el embudo Buchner. El sólido naranja se transfirió a un balón de 3 cuellos de 3 L con agitación superior. Se cargó acetato de etilo

(1200 mL) y la suspensión se agitó cerca de 30 min. Los sólidos se recolectaron por filtración. La torta se suspendió con 200 mL de EtOAc y se secó por filtración en un embudo Buchner. El proceso de suspensión/secado se repitió dos veces más y se obtuvo 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo (115,57 g, 87% rendimiento) en la forma de un sólido amarillo brillante. LCMS $m/z = 233,0$ $[M+H]^+$. ^1H NMR: (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 14,05 – 9,86 (m, 1H), 3,29 (s, 6H), 2,68 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,21 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

Paso 9: Metanosulfonato de 4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo

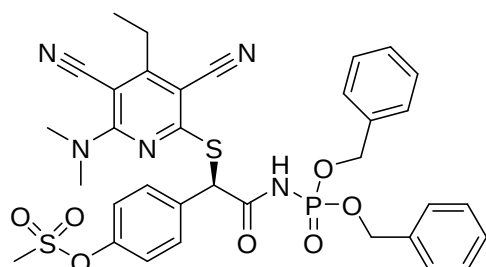


A un JLR de 16 L se le agregó diclorometano (8 L), metanosulfonato de 4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (966 g, 1,655 mol), 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo (381 g, 1,640 mol), y diclorometano (8 L). La mezcla de reacción se enfrió a 5 °C. Se agregó trietilamina (174 g, 1,722 mol) por medio de un embudo durante 21 minutos a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura de la reacción entre 3,3 °C y 4,9 °C. La mezcla de reacción se mantuvo a 5 °C durante 5 min antes de llevarla a temperatura ambiente. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción se completó. Se agregó agua (6 L) a la mezcla de reacción durante 6 min. Luego se agregó 1 L de agua adicional y la mezcla de reacción se agitó durante 13 min. Se dejó que las capas se separaran y la capa orgánica se transfirió a una damajuana de 20 L utilizando un filtro integrado. La capa acuosa se lavó con 500 mL de diclorometano y las capas se separaron. Esta capa orgánica se combinó con la capa orgánica original en la damajuana de 20 L. Las

capas orgánicas combinadas se concentraron a presión reducida en una balón de 20 L utilizando un evaporador rotativo. El semisólido espumoso/gomoso resultante se trató con 6 L de metanol y se hizo girar en un baño en evaporador rotativo a 50 °C durante 20 minutos sin vacío. Durante la rotación del matraz en el evaporador rotativo, comenzó a aparecer un sólido amarillento. Se retiró el matraz del evaporador rotativo y se dejó que la mezcla se enfriara a temperatura ambiente toda una noche. A la mañana siguiente, la mezcla se filtró con un filtro de bandeja de acero inoxidable equipado con 3 papeles de filtro grado Shark Skin. Se usó metanol (1 L) para facilitar la transferencia. El residuo del filtro se enjuagó dos veces con metanol (2 L). El sólido se secó al vacío en el filtro de bandeja haciendo pasar primero aire y luego nitrógeno sobre el sólido toda una noche. A la mañana siguiente, los sólidos se lavaron con 3 L de una mezcla de solventes, dietiléter/acetato de etilo 2:1, y se secó para obtener metanosulfonato de

4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (963 g, 82%) en la forma de un sólido de color canela. LCMS $m/z = 720,3$ $[M+H]^+$. 1H NMR: (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 10,62 - 10,52 (m, 1H), 7,63 - 7,57 (m, 2H), 7,43 - 7,38 (m, 2H), 7,36 - 7,27 (m, 8H), 7,26 - 7,20 (m, 2H), 5,82 (s, 1H), 5,11 - 4,84 (m, 4H), 3,40 (s, 3H), 3,27 (s, 6H), 2,77 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,22 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

Paso 10: **Metanosulfonato** **de**
(R)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo



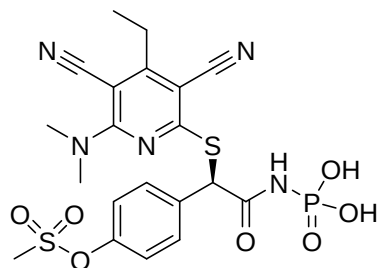
Se disolvió metanosulfonato de 4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (1 kg) en una mezcla 90:10 de acetonitrilo:metanol (se disolvieron partes de 120 g en 2 L de acetonitrilo:metanol 90:10). El material se filtró a través de un papel de fibra de vidrio y se purificó (resolvió) en una HPLC preparativa Varian, Chiralpak AS 20 u, columna de 77 × 250 mm, aplicando un método isocrático 95:5-CH₃CN:CH₃OH (50 mM NH₄OAc) para obtener el enantiómero E2 (*R*) deseado. La inyección estándar fue de 9 g de metanosulfonato de 4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo en 150 mL de fase móvil. Tras el procesamiento de 1000 g del racemato con este método, se obtuvo el enantiómero E2 (*r*) deseado en la forma de un sólido de color canela clara, con un 99,73% de pureza química (0,17% de enantiómero E1, 0,1% de impurezas). El material se aisló en un matraz de evaporación de Buchi de 20 L como un sólido con vetas marrones oscuras/negras con solvente residual. Se agregó dietiléter (1,5 L) a este material y el sólido se removió de la pared del matraz con una espátula grande. El matraz se hizo girar para obtener un sólido blancuzco suspendido en la capa etérea negra. El sólido se recolectó por filtración con un filtro de bandeja de acero inoxidable. El matraz de evaporación de Buchi se enjuagó 3 veces con el filtrado con el objeto de transferir lo máximo posible del enantiómero deseado desde el matraz. El filtrado resultante se concentró a sequedad y el residuo resultante se suspendió en dietiléter (500 mL) para obtener una segunda tanda del enantiómero deseado. Este sólido se recolectó mediante filtración en el mismo filtro de bandeja que ya contenía la primera tanda. El sólido combinado se lavó con dietiléter adicional (1 L), luego se dejó secar toda una noche al vacío para obtener metanosulfonato de (*R*)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (296,4 g, 67,6% rendimiento) en la forma de un sólido gris claro. LCMS *m/z* = 720,3 [*M*+*H*]⁺. ¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,57

(d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 7,62 - 7,58 (m, 2H), 7,43 - 7,38 (m, 2H), 7,34 - 7,27 (m, 8H), 7,25 - 7,20 (m, 2H), 5,82 (s, 1H), 5,10 - 4,84 (m, 4H), 3,39 (s, 3H), 3,26 (s, 6H), 2,76 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,21 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H). HPLC quiral: 99,6% enantiómero (*R*).

Paso 11:

Ácido

(*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico



Un balón de 3 cuellos de 12 L equipado con un agitador superior mecánico se cargó con metanosulfonato de (*R*)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (200,0 g, 278 mmol) y diclorometano (2000 mL) para obtener una solución naranja homogénea. A esta solución a temperatura ambiente se le agregó una solución de yodotrimetilsilano (122 g, 611 mmol) en diclorometano (200 mL) gota a gota por medio de un embudo durante 50 minutos. El análisis de LCMS de una parte alícuota neutralizada en MeOH/MeCN tras 25 minutos de agitación después del agregado de yodotrimetilsilano indicó el producto deseado más 4% fosfato de monobencilo (un éster). Se agregó más yodotrimetilsilano (1,660 mL, 12,19 mmol) y la suspensión naranja pálida se agitó durante 20 minutos. Después de agitar un total de 2 horas, se agregó metanol (200 mL, 4946 mmol) gota a gota por medio de un embudo durante 28 minutos. Se agregaron 200 mL más de diclorometano y se siguió agitando. Para facilitar la agitación fue necesaria una dilución adicional con 200 mL de diclorometano. La agitación continuó durante 15 minutos antes de agregar 200 mL más de diclorometano (el total de diclorometano fue de

2800 mL). La mezcla se agitó mecánicamente durante 2 horas y 45 minutos después de completar el agregado de metanol. La suspensión se dividió y se filtró a través de 6 embudos con filtros de polipropileno descartables equipados con un disco de poro fino de polietileno. Los sólidos se enjuagaron repetidamente con diclorometano hasta que ya no hubo coloración roja/rosada en el filtrado. Los sólidos blancos recolectados se secaron en los embudos al vacío, se transfirieron a un único mortero y se molieron lentamente hasta lograr un polvo fino y suelto. El sólido se colocó en un horno de vacío durante 14 horas sin calentamiento para obtener ácido

(*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico (123,4 g, 82%) en la forma de un sólido blanco. LCMS $m/z = 540,0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 11,55 (br s, 2H), 9,74 (br d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 5,79 (br s, 1H), 3,41 (s, 3H), 3,36 (s, 6H), 2,75 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,20 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H). HPLC quiral: 98,9% enantiómero (*R*).

El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) del precursor sin ácido del Ejemplo 1 se muestra en la Figura 7 y un resumen de los ángulos de difracción y los espaciados d se indican en la Tabla III a continuación.

TABLA III Resumen del precursor sin ácido del Ejemplo 1 de los ángulos de difracción de XRPD y el espaciado d

Pico n.º	Ángulo de difracción [$^{\circ}2\theta$]	Espaciado d [Å]
1	3,35	26,3903
2	6,64	13,3063
3	9,93	8,9008
4	10,28	8,5977
5	11,77	7,5142
6	13,22	6,6910
7	13,91	6,3629

8	16,56	5,3477
9	18,39	4,8217
10	19,19	4,6219
11	19,47	4,5551
12	19,74	4,4940
13	20,61	4,3065
14	20,78	4,2722
15	21,76	4,0808
16	22,18	4,0049
17	22,71	3,9118
18	23,03	3,8586
19	23,20	3,8311
20	23,58	3,7696
21	24,72	3,5988
22	25,24	3,5261
23	26,86	3,3168
24	27,39	3,2533
25	28,43	3,1370
26	29,06	3,0699
27	29,55	3,0206
28	30,05	2,9714
29	31,05	2,8777
30	32,22	2,7758
31	33,49	2,6734
32	34,80	2,5762
33	36,02	2,4917

El termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de este material precursor sin ácido es el mismo que el del equipo de DSC anterior y se muestra

en la Figura 8. Los experimentos se realizaron con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 300 °C en una placa de aluminio ligeramente ondulada. Este compuesto tiene un solo evento de fusión simple en DSC, con una temperatura inicial de 166,6 °C, una temperatura pico de 173,8 °C y una entalpía de fusión de 68 J/g, seguida de una descomposición térmica más allá de los 200 °C. El compuesto exhibió una pérdida de peso despreciable en la prueba de pérdida por TGA antes del evento de descomposición. Un experto en la materia reconocería que la temperatura inicial, la temperatura pico y la entalpía de la endoterma pueden variar según las condiciones experimentales.

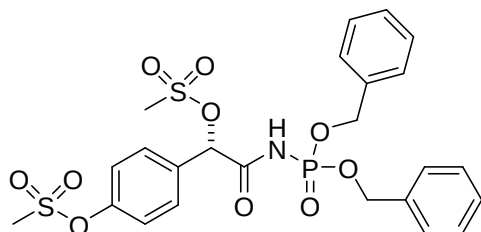
El termograma del análisis termogravimétrico (TGA) de este material precursor sin ácido es el mismo que el del equipo de TGA anterior y se muestra en la Figura 9. Los experimentos se realizaron con purga de N₂ y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 200 °C en una placa de aluminio abierta. El compuesto exhibió una pérdida de peso a 190 °C de 1,3% antes del evento de descomposición.

Método B (por medio de la vía enantioselectiva)

Ácido

(R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico

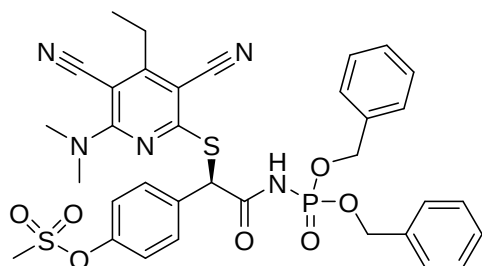
Paso 1: Metanosulfonato de (S)-4-(2-((bis(benziloxi)fosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo



Un balón de 500 mL se calentó con una pistola de calor durante aprox. 5 minutos mientras se purgaba con nitrógeno. Tras enfriar a temperatura ambiente, el balón se cargó con NaH (dispersión al 60% en aceite mineral, 1,089 g, 27,2 mmol) y

THF (120 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C y se agregó difosfato de tetrabencilo (7,99 g, 14,85 mmol), a lo que le siguió el agregado en partes de metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (4,0 g, 12,37 mmol) durante aprox. 3 minutos. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C bajo un globo cargado con nitrógeno. Después de 2 horas a 0 °C, el análisis de LCMS no mostró restos de material de partida. La mezcla de reacción se vertió con cuidado en ácido cítrico acuoso al 10% (200 mL) y se agitó vigorosamente. El precipitado resultante se recolectó mediante filtración, se enjuagó con agua (3 × 50 mL) seguida de Et₂O (3 × 50 mL) y se secó a peso constante en alto vacío para obtener metanosulfonato de (S)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (6,57 g, 11,26 mmol, 91% rendimiento) en la forma de un sólido blanco. LCMS m/z = 584,0 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,48 (br s, 1H), 7,69 – 7,57 (m, 2H), 7,48 – 7,41 (m, 2H), 7,41 – 7,22 (m, 10H), 6,11 (s, 1H), 5,13 – 4,96 (m, 3H), 4,96 – 4,88 (m, 1H), 3,40 (s, 3H), 3,28 (s, 3H). SFC quiral: 100% ee.

Paso 2: Metanosulfonato de (R)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo



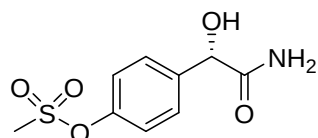
A una solución de 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo (480 mg, 2,066 mmol) en THF (20 mL) a 0 °C se le agregó NaH (83 mg, 2,066 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 30 min, luego se agregó gota a gota a una solución de metanosulfonato de (S)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (1266 mg, 2,170 mmol) en DCM (1 mL) a 0 °C. Se dejó que la mezcla alcanzara

temperatura ambiente, se agitó durante 1 h y se desactivó con cloruro de amonio. La capa acuosa se extrajo con DCM y se secó sobre sulfato de sodio. El residuo se trituró con MeOH para obtener metanosulfonato de (*R*)-4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (908 mg, 1,198 mmol, 58% rendimiento) en la forma de un sólido blancuzco. LCMS $m/z = 720,2$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,56 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 7,67 – 7,56 (m, 2H), 7,48 – 7,39 (m, 2H), 7,37 – 7,29 (m, 8H), 7,29 – 7,23 (m, 2H), 5,81 (s, 1H), 5,09 – 4,86 (m, 4H), 3,39 (s, 3H), 3,27 (s, 6H), 2,76 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,21 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H), contaminado con ~25% mesilato (material de partida). HPLC quiral: 99,3% ee.

Método C (síntesis enantioselectiva de la sal de glicina)

Sal de glicina del ácido
(*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonyl)oxi)fenil)acetil)fosforamídico

Paso 1: Metanosulfonato de (*S*)-4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo

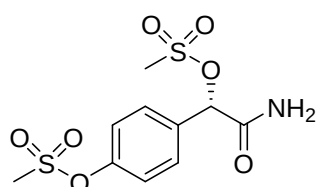


Un JLR de 1 L equipado con agitación superior se cargó con H_2O (400 mL), luego [se agregó] 2,2-bis(hidroxietil)-(iminotris)-(hidroximetil)-metano (10,8 g, 51,4 mmol) y se agitó durante 3 min con la temperatura de la camisa establecida en 20 °C. Luego se cargó una solución de sal disódica de fosfato de dinucleótido de adenina y β -nicotinamida (NADP $^{+}$, disódico) (500 mg), enzima cetorreductasa (1,50 g) y H_2O (15 mL) en el JLR y la solución resultante se agitó durante 5 min. Luego se agregó metanosulfonato de 4-(2-amino-2-oxoacetil)fenilo (50,0 g, 206 mmol), H_2O (100 mL) e isopropanol (63,4 mL, 822 mmol) y la reacción se calentó a 30 °C. Tras agitar durante 24 h, la reacción se enfrió a 0 °C y se le agregó solución acuosa de NaOH 1 N (25,0 mL). La suspensión resultante se agitó durante 23 h a 0 °C, luego los sólidos precipitados se separaron mediante filtración al vacío. Los sólidos

aislados se lavaron dos veces con H₂O (250 mL cada lavado) y luego con *tert*-butilmetiléter (250 mL). Tras secar al vacío, el producto deseado, metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo, se aisló en la forma de un sólido blanco a blancuzco (45,0 g, 184 mmol, 89% rendimiento).

LCMS m/z = 246,0 [M+H]⁺. ¹H NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7,54 – 7,49 (m, 2H), 7,42 (br s, 1H), 7,33 – 7,28 (m, 2H), 7,21 (br s, 1H), 6,13 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,89 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 3,37 (s, 3H). HPLC quiral: >99% ee.

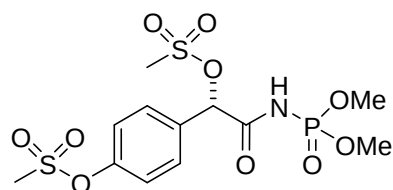
Paso 2: Metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo



Un JLR de 100 L equipado con agitación superior se cargó con metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo (2,57 g, 10,5 mmol) y N,N-dimetilacetamida (10,3 mL) y se agitó con la temperatura de la camisa establecida en 20 °C. Luego se agregó 1-metilimidazol (1,51 g, 18,4 mmol) y la reacción se enfrió a 0 °C. A la solución amarilla se le agregó lentamente anhídrido metanosulfónico (2,56 g, 14,7 mmol) como solución en N,N-dimetilacetamida (5,12 mL) manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 5 °C. Luego, la reacción se llevó a 20 °C y se agitó a esa temperatura durante 21 h. Al finalizar, la reacción se enfrió a 0 °C, se desactivó con el agregado de H₂O (26 mL) durante 1 h, a lo que le siguió el agregado de solución acuosa de sulfato de sodio al 5% (51,5 mL) durante 2 h. La suspensión resultante se agitó durante 20 h, luego los sólidos se recolectaron mediante filtración al vacío. Los sólidos aislados se lavaron dos veces con H₂O (25 mL cada lavado) y luego se lavaron dos veces con *tert*-butilmetiléter (15 mL cada lavado). Tras secar al vacío, el producto deseado, metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo, se aisló en la forma de un sólido blanco (3,14 g, 9,71 mmol, 93% rendimiento).

LCMS $m/z = 324,0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,86 (s, 1H), 7,63 – 7,54 (m, 3H), 7,41 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H), 5,91 (s, 1H), 3,41 (s, 3H), 3,26 (s, 3H).

Paso 3: **Metanosulfonato** **de**
(S)-4-(2-((dimetoxifosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo

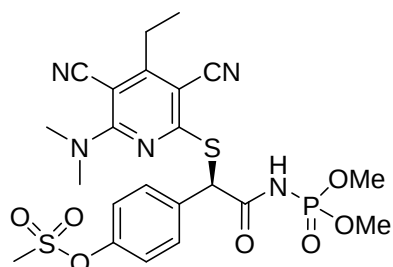


Un JLR de 1 L purgado con nitrógeno y equipado con agitación superior se cargó con tetrahidrofurano (200 mL) seguido de metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (40 g, 124 mmol), luego se agitó durante aproximadamente 5 min con la temperatura de la camisa establecida en 20 °C. Luego, la suspensión se enfrió a 0 °C y se cargó clorofosfato de dimetilo (20 mL, 186 mmol) en el reactor. Tras agitar durante 1 h, se agregó lentamente una solución 1 M de *tert*-butóxido de litio en tetrahidrofurano (272 mL, 272 mmol) manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de 5 °C. La reacción se agitó durante aproximadamente 1 h y un análisis por medio de HPLC determinó que estaba incompleta. Se cargó más clorofosfato de dimetilo (6,3 mL, 58 mmol) a la reacción, a lo que le siguió el agregado lento de solución 1 M de *tert*-butóxido de litio en tetrahidrofurano (37,1 mL, 37,1 mmol). La reacción se agitó durante 30 min, luego se desactivó por medio del agregado lento de solución acuosa al 10% de ácido cítrico (w/w, 40 mL) manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de 5 °C. La reacción se agitó durante aproximadamente 15 min, luego se cargó más solución acuosa al 10% de ácido cítrico (w/w, 80 mL) manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de 5 °C. La temperatura se elevó a 20 °C y se mantuvo a esa temperatura durante aproximadamente 30 min. Luego, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se mantuvo durante aproximadamente 14 h. La reacción se concentró por medio de destilación al vacío hasta un volumen total

aproximado de 300 mL. Se cargó isopropanol (380 mL) a la reacción y se la agitó a 20 °C durante 2 h. La reacción se concentró por medio de destilación al vacío hasta un volumen total aproximado de 520 mL, luego se agregó H₂ (80 mL) e isopropanol (80 mL) y la reacción se enfrió a 0 °C. Tras agitar durante 19 h, la suspensión de producto se transfirió a un filtro secador. Los licores madre se separaron mediante filtración con presión de nitrógeno. El reactor se enjuagó con H₂O (400 mL), luego se transfirió al filtro secador para lavar los sólidos aislados. Se usó presión de nitrógeno para empujar el [líquido de] lavado a través del residuo del filtro del producto. El reactor se enjuagó con isopropanol (400 mL), luego se transfirió al filtro secador para lavar los sólidos aislados. Se usó presión de nitrógeno para empujar el [líquido de] lavado a través del residuo del filtro del producto. Los productos sólidos se lavaron con *tert*-butilmetiléter (200 mL). Los sólidos aislados se secaron en atmósfera de nitrógeno durante 23 horas, luego se secaron al vacío a 20°C durante 21 h para obtener el producto deseado, metanosulfonato de (S)-4-(2-((dimetoxifosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo, en la forma de un sólido blanco (35,1 g, 81 mmol, 66% rendimiento).

LCMS m/z = 454,1 [M+Na]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10,28 (br s, 1H), 7,60 - 7,68 (m, 2H), 7,44 - 7,51 (m, 2H), 6,07 (s, 1H), 3,67 (d, J = 12 Hz, 3H), 3,57 (d, J = 12 Hz, 3H), 3,43 (s, 3H), 3,30 (s, 3H). HPLC quiral: >99% ee.

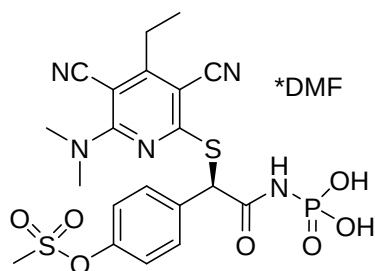
Paso 4: **Metanosulfonato de (R)-4-(1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-((dimetoxifosforil)amino)-2-oxoetil)fenilo**



Un JLR de 1 L purgado con nitrógeno y equipado con agitación superior se cargó con H₂O (338 mL), y carbonato de sodio (5,18 g, 48,9 mmol), luego se agitó a 20 °C. Las paredes del reactor se enjuagaron con H₂O adicional (42,0 mL); luego, la mezcla se agitó durante 10 min. Se cargó acetona (170 mL) seguida de 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo (22,7 g, 98,0 mmol) y más acetona (42,0 mL). La mezcla se agitó durante aproximadamente 1 h, luego se agregó metanosulfonato de (S)-4-(2-(((dimetoxifosforil)amino)-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (42,2 g, 98,0 mmol) en una parte. La reacción se agitó durante 2 h, luego los sólidos precipitados se recolectaron mediante filtración al vacío. Los sólidos aislados se lavaron dos veces con H₂O (126 mL cada lavado) y luego dos veces con isopropanol (210 mL cada lavado), luego *tert*-butilmetiléter (420 mL) y se insufló aire con una corriente de nitrógeno durante 15 h. El residuo del filtro del producto se resuspendió con *tert*-butilmetiléter (336 mL). Tras mezclar durante aproximadamente 10 min, los sólidos se filtraron a sequedad y se enjuagaron con más *tert*-butilmetiléter (126 mL) Tras secar al vacío, el producto deseado, metanosulfonato de (R)-4-(1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(((dimetoxifosforil)amino)-2-oxoetil)fenilo, se recolectó para obtener un sólido blancuzco (50,6 g, 88,0 mmol, 90% rendimiento).

LCMS m/z = 568,1 $[M+H]^+$. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10,33 - 10,43 (m, 1H), 7,55 - 7,66 (m, 2H), 7,36 - 7,48 (m, 2H), 5,81 (br s, 1H), 3,64 (d, J = 12 Hz, 3H), 3,52 (d, J = 12 Hz, 3H), 3,42 (s, 3H), 3,37 (s, 6H), 2,77 (q, J = 8 Hz, 2H), 1,21 (t, J = 8 Hz, 3H). HPLC quiral: >99% ee.

Paso 5: Hemisolvato de ácido (R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico en DMF

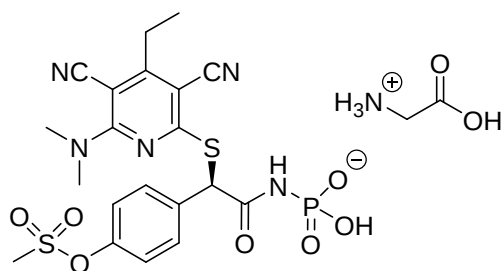


Un JLR de 2 L purgado con nitrógeno se cargó con diclorometano (250 mL) y metanosulfonato de (R)-4-(1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-((dimetoxifosforil)amino)-2-oxoetil)fenilo (65,0 g, 115 mmol); luego, las paredes del reactor se lavaron con más diclorometano (100 mL) hasta obtener una solución homogénea de color canela. Tras enfriar esta solución a 0 °C, se cargó yodotrimetilsilano (42,1 mL, 309 mmol) manteniendo la temperatura interna por debajo de 5 °C. La mezcla de reacción marrón resultante se agitó durante 1 h a 0 °C. El análisis por HPLC de la mezcla de reacción indicó que la reacción estaba incompleta, por lo que se cargó más yodotrimetilsilano (3,12 mL, 22,9 mmol). Tras agitar durante 13 minutos, la reacción se desactivó agregando aproximadamente 50% de la solución de desactivación de DMF (91 mL) manteniendo la temperatura interna por debajo de 5 °C (Nota: La solución de desactivación de DMF se preparó agregando H₂O [3,30 mL, 183 mmol] a DMF anhidro [179 mL]). La mezcla de reacción se mantuvo a 0 °C durante 3 minutos, luego la cristalización se sembró con hemisolvato de ácido (R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico en DMF (165 mg), se suspendió en diclorometano (6,50 mL) y se mantuvo a 0 °C durante aproximadamente 30 minutos. La suspensión fluida se diluyó aún más por medio del agregado en partes de diclorometano (650 mL), luego se agitó a 0 °C durante aproximadamente 30 minutos. El remanente aproximado del 50% de la solución de desactivación de DMF (91 mL) se cargó lentamente manteniendo la temperatura interna por debajo de 5 °C. Al completar el agregado, la temperatura de la camisa se llevó a

20 °C a una velocidad de 2 °C/min y se mantuvo a 20 °C durante aproximadamente 45 min. La suspensión de la reacción se diluyó aún más con diclorometano (650 mL) y se agitó durante 12 h. Los sólidos precipitados se recolectaron mediante filtración al vacío, luego se lavaron dos veces con diclorometano (325 mL por lavado). Los sólidos se resuspendieron con acetato de etilo (325 mL) durante aproximadamente 2,5 h a 20 °C, se aislaron mediante filtración al vacío, luego se secaron al vacío para obtener hemisolvato de ácido (*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico en DMF (58,4 g, 101 mmol, 89% rendimiento) en la forma de un producto blanco a blancuzco. ¹H NMR muestra la relación producto:DMF como 1:0,8.

LCMS *m/z* = 540,0 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10,77 - 12,19 (br s, 1 H), 9,75 (br d, *J* = 9,5 Hz, 1 H), 7,96 (s, 0,8 H, DMF), 7,58 - 7,65 (m, 2 H), 7,31 - 7,46 (m, 2 H), 5,80 (br s, 1 H), 3,42 (s, 3 H), 3,37 (m, 6 H), 2,90 (s, 2,8 H, DMF), 2,74 (m, 4,8 H, incluye DMF), 1,21 (t, *J* = 7,5 Hz, 3 H). HPLC quiral: >99% ee.

Paso 6: Sal de glicina del ácido (*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico



El proceso se llevó a cabo en un par de JLR de 16 L, marcados como reactor A y reactor B, cada uno de ellos equipado con agitación superior. Se cargó glicina micronizada (71,5 g, 0,952 mmol), diclorometano (9 L) y metanol (896,5 mL) en el reactor A y las mismas cargas se repitieron en el reactor B. Las mezclas se agitaron a 25 °C. Luego, se cargó una suspensión de hemisolvato de ácido

(*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)f enil)acetil)fosforamídico en DMF (137,5 g, 0,238 mmol) en acetato de etilo (1,1 L) en el reactor A durante al menos 15 min. El recipiente con la suspensión se enjuagó con acetato de etilo (550 mL); luego, este enjuague se transfirió al reactor. La carga de la suspensión y el enjuague con acetato de etilo se repitieron en el reactor B. Las cristalizaciones en los reactores A y B se sembraron con sal de glicina del ácido (*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)f enil)acetil)fosforamídico (5,5 g). El proceso de agregado lento de hemisolvato de ácido (*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)f enil)acetil)fosforamídico en DMF (137,5 g, 0,238 mol) en acetato de etilo (1,1 L), enjuague del recipiente con acetato de etilo (550 mL) y transferencia del enjuague a los reactores A y B se repitió 3 veces en cada reactor tras la siembra. Las suspensiones se agitaron a 25 °C toda una noche y la reacción se completó. Las mezclas de suspensión de los reactores A y B se vaciaron en un filtro de bandeja de acero inoxidable equipada con papel de filtro. Los licores madre se separaron mediante filtración con presión de vacío. Cada uno de los reactores A y B se enjuagó con acetato de etilo (3,3 L), luego se realizó una transferencia al filtro de bandeja para lavar los sólidos aislados y se filtró. Los enjuagues de los reactores A y B con acetato de etilo se repitieron por segunda vez. Se usó presión de vacío para empujar el [líquido de] lavado a través del residuo del filtro del producto. Los sólidos aislados se secaron al vacío a 50 °C hasta que el análisis de LOD dio <1% para obtener sal de glicina del ácido (*R*)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)f enil)acetil)fosforamídico (1101 g, 1,791 mol, 92,5% rendimiento) en la forma de un sólido blanco. ¹H NMR muestra la relación producto:glicina como 1:1. LCMS *m/z* = 540,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 9,41 (br d, *J* = 7,50 Hz, 1 H), 7,66 (br d, *J* = 8,0 Hz, 2 H), 7,36 (br d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 5,80 (s, 1 H), 3,48 (s, 2 H), 3,41 (s, 3 H), 3,34 (s, 7 H), 2,74 (q, *J* = 7,5 Hz, 3 H), 1,19 (t, *J* = 7,5 Hz, 3 H). HPLC quiral: >99% ee.

Compuesto cristalino del Ejemplo 1, compuesto de glicina con ácido (R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil) fosforamídico (1:1).

El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de este material se muestra en la Figura 1 y un resumen de los ángulos de difracción y los espaciados d se indican en la Tabla I a continuación. El análisis por XRPD se realizó en un difractómetro PANalytical X'Pert Pro sobre portamuestras de Si de fondo cero usando un detector X'celerator™ RTMS (multibanda en tiempo real) Las condiciones de adquisición incluyeron: Radiación Cu K_α, longitud de onda (λ): 1,5405980 Å, tensión del generador: 45 kV, corriente del generador: 40 mA, tamaño del paso: 0,0167° 2θ. Configuración del lado del haz incidental: rendija de divergencia programable, 10 mm; rendijas Soller, 0,02 rad; rendija antidispersión (0,5 °) y máscara de haces de 10 mm. Configuración del lado del haz difractado: conjunto de rendija antidispersión programable de 10 mm (módulo X'celerator) y rendija Soller de 0,02 rad.

TABLA I: XRPD - Resumen de los ángulos de difracción y el espaciado d

Pico n.º	Ángulo de difracción [°2θ]	Espaciado d [Å]
1	5,42	16,3027
2	5,78	15,2672
3	7,44	11,8749
4	9,59	9,2110
5	10,56	8,3679
6	10,81	8,1745
7	11,55	7,6557
8	13,04	6,7854
9	14,46	6,1218
10	14,84	5,9641
11	15,56	5,6903

12	16,25	5,4518
13	17,01	5,2072
14	18,32	4,8394
15	18,82	4,7116
16	19,00	4,6665
17	19,20	4,6182
18	19,60	4,5246
19	20,49	4,3310
20	20,99	4,2287
21	21,18	4,1924
22	21,54	4,1216
23	21,69	4,0934
24	22,34	3,9755
25	22,65	3,9233
26	23,20	3,8313
27	23,95	3,7127
28	24,42	3,6426
29	24,99	3,5610
30	25,17	3,5354
31	26,22	3,3958
32	26,54	3,3559

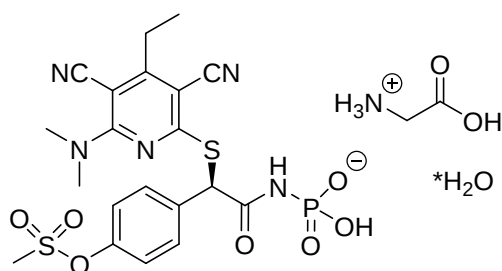
El termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de este material se registró en un calorímetro diferencial de barrido Discovery (TA Instruments) equipado con un inyector automático y un sistema de enfriamiento refrigerado con una purga de 40 mL/min N₂, el que se muestra en la Figura 2. Los experimentos se realizaron con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 200 °C en una placa de aluminio ligeramente ondulada. Este compuesto tiene un solo evento de fusión simple en DSC, con

una temperatura inicial de 183,6 °C, una temperatura pico de 188,8 °C y una entalpía de fusión de 64 J/g. La determinación de la entalpía de fusión no es confiable debido a la descomposición térmica inmediata tras la fusión. El compuesto exhibió una pérdida de peso insignificante por TGA antes del evento de descomposición. Un experto en la materia reconocería que la temperatura inicial, la temperatura pico y la entalpía de la endoterma pueden variar según las condiciones experimentales.

El termograma del análisis termogravimétrico (TGA) de este material se registró en un analizador termogravimétrico Discovery (TA Instruments) y se muestra en la Figura 3. Los experimentos se realizaron con purga de N₂ y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 200 °C en una placa de aluminio abierta. El compuesto exhibió una pérdida de peso a 160 °C de 0,3% antes del evento de descomposición.

Cada uno de los puntos generales en los párrafos anteriores en relación con XRPD, DSC y TGA es aplicable a cada uno de los análisis de XRPD, DSC y TGA realizados en esta solicitud. Además, en todos los datos de XRPD informados en este caso, los datos tenían una exactitud de más o menos 0,2.

Paso 7: Sal de glicina monohidrato del ácido (R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico monohidrato



Un JLR de 50 mL equipado con agitación superior se cargó con hemisolvato de ácido

(R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico en DMF (1,5 g, 2,54 mmol) y acetato de etilo (37,5 mL).

Durante la agitación, la camisa del reactor se calentó a 50 °C a [una velocidad de] 1 °C/min y se mantuvo a 50 °C durante 95 minutos. Se cargó una solución de glicina 2 M en agua (2,67 mmol glicina) en una unidad dosificadora de 10 mL adjunta. Se cargó glicina 2 M en agua (1,33 mL) a la mezcla de reacción durante 90 minutos. Tras la carga, la mezcla se mantuvo durante 60 minutos, luego se la enfrió a 5 °C a 0,25 °C/min. La mezcla de reacción se mantuvo a 5 °C durante 60 minutos. Luego, se programó la mezcla de reacción para que completara dos ciclos térmicos durante la noche: calentamiento a 50 °C a 1 °C/min, mantenimiento a 50 °C, enfriamiento a 5 °C a 0,25 °C/min y mantenimiento a 5 °C durante 60 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a 5 °C durante 4,5 días; luego se filtró a través de un embudo con filtro descartable. El residuo húmedo de los sólidos de la reacción se enjuagó dos veces con acetato de etilo (2 × 9 mL) y se filtró. El sólido se colocó toda una noche en un horno de vacío a 25 °C y se secó para obtener sal de glicina del ácido (R)-(2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico, hidrato (1,55 g, 2,45 mmol) en la forma de un sólido blanco.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 9,34 (s, 1 H), 7,65 (br d, *J* = 7,5 Hz, 2 H), 7,36 (br d, *J* = 7,5 Hz, 2 H), 5,79 (br s, 1 H), 3,40 (s, 6 H), 3,35 (br s, 9 H), 2,74 (q, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 1,19 (t, *J* = 7,0 Hz, 3 H). HPLC quiral: >99% ee.

El patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) del glicinato monohidrato del Ejemplo 1 se muestra en la Figura 4 y un resumen de los ángulos de difracción y los espaciados *d* se indican en la Tabla II a continuación.

TABLA II Resumen del glicinato monohidrato del Ejemplo 1 de los ángulos de difracción de XRPD y el espaciado *d*

Pico n.º	Ángulo de difracción [°2θ]	Espaciado <i>d</i> [Å]
1	5,13	17,2011
2	5,75	15,3532
3	7,27	12,1458

4	9,28	9,5245
5	10,26	8,6117
6	10,61	8,3277
7	11,52	7,6772
8	12,87	6,8726
9	13,86	6,3858
10	14,56	6,0794
11	15,43	5,7389
12	16,31	5,4293
13	17,32	5,1171
14	18,52	4,7872
15	19,15	4,6299
16	19,89	4,4604
17	20,84	4,2586
18	21,23	4,1824
19	22,11	4,0168
20	22,55	3,9404
21	23,13	3,8421
22	23,83	3,7305
23	24,13	3,6847
24	25,47	3,4942
25	26,06	3,4171
26	27,91	3,1941
27	28,65	3,1137
28	29,05	3,0716
29	29,90	2,9860
30	30,42	2,9363

31	30,82	2,8990
32	31,34	2,8522
33	32,91	2,7196
34	33,38	2,6825
35	36,72	2,4456

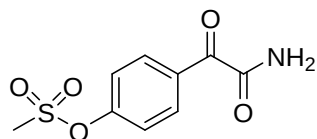
El termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de este material, glicinato hidratado, es el mismo que el del equipo de DSC anterior y se muestra en la Figura 5. Los experimentos se realizaron con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 250 °C en una placa de aluminio ligeramente ondulada. Este compuesto tiene un evento de amplia deshidratación endoterma de 40 °C a 140 °C, seguido de una nítida endoterma de fusión, con una temperatura inicial de 175,5 °C, una temperatura pico de 179,3 °C y una entalpía de fusión de 52 J/g. La determinación de la entalpía de fusión no es confiable debido a la descomposición térmica inmediata tras la fusión. Un experto en la materia reconocería que la temperatura inicial, la temperatura pico y la entalpía de la endoterma pueden variar según las condiciones experimentales.

El termograma de análisis termogravimétrico (TGA) de este material, glicinato hidratado, es el mismo que el del equipo de TGA anterior y se muestra en la Figura 6. Los experimentos se realizaron con purga de N₂ y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 250 °C en una placa de aluminio abierta. El compuesto exhibió una pérdida de peso de 3,0% desde 40 °C hasta 140 °C, lo que indica una forma mórfica de monohidrato antes del evento de descomposición.

Ejemplo 2

Metanosulfonato **de**
(R)-4-(2-amino-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo

Paso 1: Metanosulfonato de 4-(2-amino-2-oxoacetil)fenilo

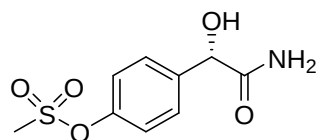


A una suspensión agitada de metanosulfonato 4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo (50 g, 204 mmol) en acetonitrilo (3000 mL) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente se le agregó dióxido de manganeso (248 g, 2854 mmol) en una carga durante 1 minuto. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 16 horas y luego se calentó a 80 °C durante 48 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró mediante Celite y el lecho de Celite se lavó con acetonitrilo (2000 mL). El filtrado se concentró a presión reducida para obtener 44 g del producto en bruto deseado en la forma de un sólido blancuzco. El análisis del material mediante UPLC MS indicó que el 46,67% del área bajo la curva correspondía a la masa del producto y que el 48,26% del área bajo la curva correspondía a la masa del material de partida. La mezcla de producto en bruto/material de partida se sometió a una reacción de oxidación mediante PCC como se describe a continuación.

A una solución agitada que contenía una mezcla de metanosulfonato de 4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo y metanosulfonato de 4-(2-amino-2-oxoacetil)fenilo (42,0 g, 86 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (2,4 L) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente se le agregó PCC (18,53 g, 86 mmol) mediante mezclado con Celite en una carga. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró mediante Celite y el lecho de Celite se lavó con (2000 mL) de THF. El filtrado se concentró al vacío para obtener el producto en bruto en la forma de un sólido marrón oscuro. El producto en bruto se disolvió en una mezcla de 100 mL de metanol y 150 mL de DCM y se absorbió sobre 400 g de sílice (malla 60-120). El material resultante se filtró a través de 4 kg de sílice (malla 230-400) y el lecho de sílice se lavó con (3000 mL) de acetato de etilo. El filtrado se concentró al vacío para obtener metanosulfonato de 4-(2-amino-2-oxoacetil)fenilo (26 g, 52%) en la forma de un sólido blancuzco. LCMS $m/z = 244,0$ $[M+H]^+$. ^1H NMR

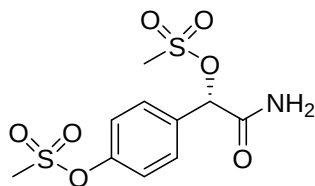
(400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 8,37 (br s, 1H), 8,13-8,09 (m, 2H), 8,06 (br s, 1H), 7,58-7,54 (m, 2H), 3,49 (s, 3H).

Paso 2: Metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo



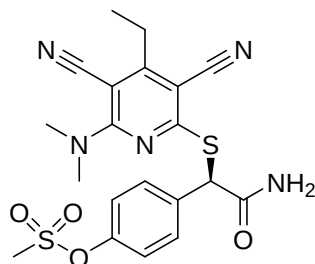
Un balón de 500 mL con barra de agitación superior se cargó con metanosulfonato de 4-(2-amino-2-oxoacetil)fenilo (5,0 g, 20,56 mmol) e isopropanol (10 mL). A la mezcla resultante se le agregaron 80 mL de una solución 1,25 mg/mL de sal disódica de fosfato de dinucleótido de adenina y β -nicotinamida (NADP⁺, disódico) (100 mg, 20,56 mmol) en tampón KPi 0,1 M pH 7,0, a lo que le siguió la enzima cetorreductasa de SynBio, ID de secuencia S00000617 (300 mg, 20,56 mmol). La suspensión resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Tras un total de 46 horas, la capa acuosa se saturó con KCl sólido y la mezcla se diluyó con EtOAc (200 mL). Se formó una emulsión, por consiguiente, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite® y se enjuagó con gran cantidad de EtOAc (3 $\times$ 75 mL) hasta obtener capas nítidas transparentes. La capa orgánica se lavó con salmuera y las capas acuosas combinadas se retroextrajeron con EtOAc (2 $\times$ 75 mL). Las [capas] orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se secó a peso constante en alto vacío para obtener metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo (4,40 g, 87% rendimiento) en la forma de un sólido blanco. LCMS m/z = 246,0 [M+H]⁺. ¹HNMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7,54 – 7,49 (m, 2H), 7,42 (br s, 1H), 7,33 – 7,28 (m, 2H), 7,21 (br s, 1H), 6,13 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 4,89 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 3,37 (s, 3H). HPLC quiral: >99% ee.

Paso 3: **Metanosulfonato** **de**
(S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo



A una suspensión fría (0 °C) de metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-hidroxi-2-oxoetil)fenilo (4,3 g, 17,53 mmol) en diclorometano (DCM) (40 mL) se le agregó Ms-Cl (1,639 mL, 21,04 mmol) durante aprox. 1 minuto, a lo que le siguió TEA (3,67 mL, 26,3 mmol) durante aprox. 3 minutos. Después de 2 horas, la LCMS mostró aprox. 15% de material de partida (sin progresión adicional tras 3 horas), por lo tanto, la mezcla de reacción se volvió a enfriar a 0 °C y se agregaron partes adicionales de Ms-Cl (0,410 mL, 5,26 mmol) y TEA (1,222 mL, 8,77 mmol). Se retiró el baño de baño de hielo y se dejó que la reacción alcanzara temperatura ambiente. Después de 30 minutos más, la mezcla de reacción se desactivó con solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL) y se agitó vigorosamente. La suspensión/emulsión resultante se filtró y el sólido se enjuagó en secuencia con agua (3 × 30 mL) y dietiléter (3 × 30 mL) y se secó a peso constante en alto vacío para obtener metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (4,44 g, 78% rendimiento) en la forma de un sólido levemente blancuzco. LCMS m/z = 324,0 [M+H]⁺. ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 7,86 (s, 1H), 7,63 – 7,54 (m, 3H), 7,41 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 5,91 (s, 1H), 3,41 (s, 3H), 3,26 (s, 3H).

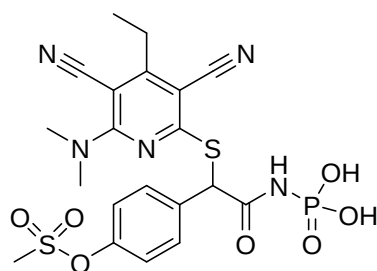
Paso 4: Metanosulfonato de (R)-4-(2-amino-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo



A una suspensión de 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo (1,437 g, 6,19 mmol) en acetato de etilo (50 mL) se le agregó iPr_2EtN (1,350 mL, 7,73 mmol). La suspensión naranja se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se agregó una suspensión de metanosulfonato de (S)-4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenilo (2,0 g, 6,19 mmol) en acetato de etilo (30 mL) y la suspensión naranja resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 4 horas, el interior del matraz se raspó con una espátula, lo que dio inicio a la precipitación del producto. La suspensión resultante se agitó otros 30 minutos, luego se enfrió a 0 °C. El precipitado se recolectó mediante filtración usando un embudo con filtro, se enjuagó en secuencia con EtOAc frío (0 °C) (2 × 20 mL), agua (2 × 10 mL), EtOAc frío (0 °C) (2 × 20 mL) y dietiléter (2 × 10 mL). El sólido se secó durante 48 horas en alto vacío para obtener metanosulfonato de (R)-4-(2-amino-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (1,37 g, 48,2% rendimiento) en la forma de un sólido blancuzco. LCMS m/z = 460,2 $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,96 (s, 1H), 7,62 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,42 – 7,31 (m, 3H), 5,66 (s, 1H), 3,39 (s, 3H), 3,33 (s, 6H), 2,75 (q, J = 7,8 Hz, 2H), 1,20 (t, J = 7,8 Hz, 3H).

Ejemplo 3

ácido (2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico

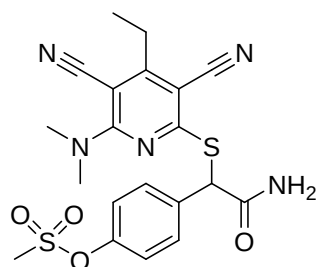


A una solución de metanosulfonato de 4-(2-((bis(benciloxi)fosforil)amino)-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenilo (77,34 g, 107 mmol) en acetonitrilo (1 L) a 0 °C se agregó yodotrimetilsilano (34 mL, 247 mmol) y la

mezcla se calentó hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se desactivó con 1,2 L de metabisulfito de sodio al 10%. Se formó un precipitado en la mezcla espesa se agitó. La mezcla se filtró y el sólido recogido se lavó con 1 L de agua. Se secó en el embudo de filtro al vacío durante la noche. El sólido resultante se suspendió en 2 L de éter y se agitó durante 30 min. La mezcla se filtró y el sólido recogido se secó para obtener ácido (2-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-(4-((metilsulfonil)oxi)fenil)acetil)fosforamídico (32 g, 59,3 mmol, 55,2% de rendimiento) como un sólido blancuzco. LCMS m/z = 540,0 $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9,48 (s, 1H), 7,66 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,35 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,81 (s, 1H), 3,40 (s, 3H), 3,34 (s, 6H), 2,74 (q, J = 7,6 Hz, 2H), 1,20 (t, J = 7,6 Hz, 3H) (2 no se observaron protones de fosfato).

Ejemplo 4

metanosulfonato de 4-(2-amino-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenil



A una suspensión amarilla de 2-(dimetilamino)-4-etil-6-mercaptopiridin-3,5-dicarbonitrilo (2,0 g, 8,61 mmol) en acetato de etilo (50 mL) se agregó secuencialmente DIEA (1,880 mL, 10,76 mmol) y metanosulfonato de 4-(2-amino-1-((metilsulfonil)oxi)-2-oxoetil)fenil (2,78 g, 8,61 mmol) en una porción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El sólido se recogió mediante filtración, se enjuagó con acetato de etilo, agua y más acetato de etilo. Se secó el sólido para obtener 3,50 g de un sólido amarillo pálido. El material sólido se suspendió en 30 mL de agua y se agitó durante 1 hora. Se recogió el sólido mediante filtración, se enjuagó con agua y se secó para obtener

metanosulfonato de 4-(2-amino-1-((3,5-diciano-6-(dimetilamino)-4-etilpiridin-2-il)tio)-2-oxoetil)fenil (3,09 g, 76%) como un sólido amarillo pálido. LCMS $m/z = 460,0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,97 (s, 1H), 7,65-7,59 (m, 2H), 7,41-7,34 (m, 3H), 5,65 (s, 1H), 3,40 (s, 3H), 3,33 (s, 6H), 2,75 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,20 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H).

DATOS BIOLÓGICOS

Ensayo de proximidad de centelleo (SPA) de DNMT1: Ensayo A (DNMT1 humana)

Este ensayo utilizó la tecnología de proximidad de centelleo con aumento de señal para evaluar la potencia de los compuestos. Para monitorear la actividad se utilizaron DNMT1 humana de longitud completa, dúplex* de DNA hemimetilado y SAM tritiada. La creación de la placa de ensayo consistió de los siguientes parámetros: 500 nL de una dilución en serie de base 3 de 11 puntos del compuesto se sembró en una placa Costar de 96 pocillos (n.º 3884). La mezcla de tampón del ensayo se preparó el día del ensayo y consistió en lo siguiente: 20 mM Tris pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM y glicerol al 5%. Luego se preparó una mezcla de enzimas 2X que consistió en la proteína DNMT1 30 nM (DNMT humana de longitud completa, de preparación interna) en el tampón de ensayo. La mezcla de sustrato 2X se preparó por último y consistió de 40mer DNA hemimetilado* 160 nM, 3H -SAM 0,48 μ M y SAM frío 2,92 μ M en tampón de ensayo (3H -SAM se agrega a lo último). La desactivación (SAH 1 mM) se realizó en gran cantidad y se congeló a -20 C hasta el momento de utilizarlo. Se agregaron 10 uL de la mezcla de sustrato 2X a toda la placa utilizando una pipeta electrónica multicanal. La placa se agitó durante al menos 10 s entre las adiciones para asegurar el mezclado. A continuación, se agregaron 20 uL de la mezcla de desactivación 2X a la columna 12 utilizando una pipeta multicanal (agitar la placa). Con una pipeta electrónica multicanal, se agregaron 10 uL de la mezcla de enzima 2X a toda la placa comenzando con la columna 11 hacia la columna 10 (la columna 12 fue la última para evitar la contaminación de predesactivación). Las placas se incubaron en el agitador de placas durante

30 min con las placas cubiertas. Al finalizar el periodo de incubación, se agregaron 20 uL de mezcla de desactivación a todos los pocillos salvo a la columna 12 (agitar la placa), seguido por la adición de 20 uL de microesferas de SPA PerkinElmer PEI PVT de 3 mg/mL (Cat. n.º RPNQ0097) diluidos en agua exenta de DNAsa y se agitó durante 30 minutos. Las placas se sellaron con un sello transparente y se centrifugaron a 500 rpm durante 1 min. Las placas se leyeron en un MicroBeta (PerkinElmer, lectura para ^3H (1 min/pocillo).

Se utilizó Microsoft Excel para analizar los datos hasta Vi/Vo y se utilizó GraFit para ajustar los datos. Las respuestas se normalizaron para los controles sin inhibición (DMSO) y predesactivados en cada placa. Las curvas de respuesta a la dosis se analizaron utilizando un ajuste logístico de tres parámetros con $Y_{\min}$ restringido a 0 y los resultados se expresaron como valores IC_{50} .

Condiciones finales del ensayo: Tris 20 mM (Hampton Research. HR-937-06), pH 7,5,

DTT 1 mM (Invitrogen. P2325), EDTA 1 mM (Invitrogen. AM9260G), Glicerol al 5% (Teknova. G1796), Pluronic F127 0,02% (Life Technologies. P6866), DNMT1 15 nM (DNMT1 humana de longitud completa. GSK de preparación interna), ^3H -SAM 240 nM (PerkinElmer. NET155H001MC), SAM fría 1460 nM (New England Biolabs. B9003S) y

40-mer oligonucleótido de DNA hemimetilado 80 nM (Integrated DNA Technologies. preparado a medida), SAH 1 mM (Sigma A9384) y microesferas de SPA PEI PVT 1 mg/mL (PerkinElmer RPNQ0097) resuspendidas en agua.

* dúplex de oligómero de 40mer me-DNA:
 5'-CCTCTTCTAACTGCCAT(Me-dC)GATCCTGATAGCAGGTGCATGC-3'
 5'-GCATGCACCTGCTATCAGGATCGATGGCAGTTAGAAGAGG-3'

Ensayo de proximidad de centelleo (SPA) de DNMT1: Ensayo B (DNMT1 humana truncada (601-1600))

Este ensayo utilizó la tecnología de proximidad de centelleo con aumento de señal para evaluar la potencia de los compuestos. Para monitorear la actividad

se utilizaron DNMT1 humana truncada (601-1600), oligonucleótido monocatenario de sitio CpG hemimetilado y SAM tritiado. La creación de la placa de ensayo consistió de los siguientes parámetros: Se sembraron 100 nL de los compuestos 10 mM (11 puntos, dilución en serie de base 3) por pocillo (100X en DMSO al 100%) en una placa blanca de 384 pocillos LV Griener (n.º 784075). La mezcla de tampón del ensayo se preparó el día del ensayo y consistió en lo siguiente: tampón base: (Hepes 500 mM, pH 8, MgCl₂ 1 M preparado con antelación, almacenado a temperatura ambiente como solución madre), NP40-Surfact AMPS al 10%, BSA ultra pura 50 mg/mL al 10% y DTT 2 M (DL-Ditioltreitol). La mezcla de enzima 2X se preparó de la siguiente manera: Proteína DNMT1 (DNMT1 humana truncada: 601 a 1600, de preparación interna a concentración madre 16,876 uM) agregada a la mezcla del tampón de ensayo. La mezcla de sustrato 2X se hizo al final y consistió en lo siguiente: 40-mer Oligonucleótido de DNA hemimetilado 1 mM, 3H-SAM (Adenosil-L-Metionina-S-[metil-3H] actividad específica 55 Ci/mmol a 85 Ci/mmol) 12,5 uM y solución de S-Adenosil-L-Metionina 32 mM (diluida a 1 mM en H₂O exenta de Nucleasa antes de agregarla a la mezcla de sustrato) agregados a la mezcla de tampón de ensayo (3H-SAM se agregó último). Se repartieron 5 uL de la mezcla del tampón de ensayo en la columna 18 utilizando ÚNICAMENTE un Thermo Multidrop combi. A continuación, se repartieron 5 uL de la mezcla de enzima 2X en las columnas 1 a 17, 19 a 24 utilizando un Thermo Multidrop combi. Luego, se repartieron 5 uL de la mezcla de sustrato 2X en toda la placa utilizando un Thermo Multidrop combi. Las placas se apilaron e incubaron durante 40 con una placa de cubierta sobre la placa superior. La mezcla de desactivación se preparó aproximadamente a los 25 minutos del paso de incubación, consistió en lo siguiente: Solución de S-Adenosil-L-Metionina 32 mM y microesferas de imagen PerkinElmer PEI PS (Cat. # RPNQ0098) (10 mg/mL) en H₂O exenta de nucleasa. La mezcla de desactivación se agitó en vórtice antes de utilizarla para disolver en solución las microesferas. Después de 40 minutos de incubación, se repartieron 10 uL de la mezcla de desactivación en toda la placa utilizando un

Thermo Multidrop combi. Las placas se sellaron con un sello transparente, se centrifugaron a 1000 rpm/1 min y se adaptaron a la oscuridad durante 30 minutos. Las placas se leyeron en un Viewlux [PerkinElmer, filtro de emisión de 613 nm, exposición doble de 300 segundos, (tiempo total de lectura: 10 min)]. Se utilizó la base de datos de Abase para analizar los datos. Las respuestas se normalizaron para los controles sin inhibición (DMSO) y bajos en cada placa. Las curvas de respuesta a la dosis se analizaron utilizando un ajuste logístico de cuatro parámetros y los resultados se expresaron como valores pIC₅₀.

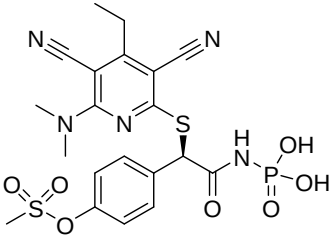
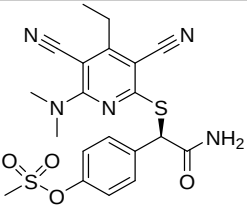
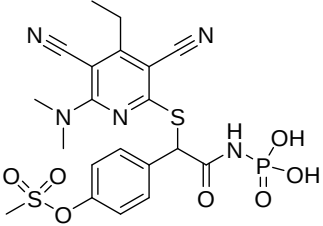
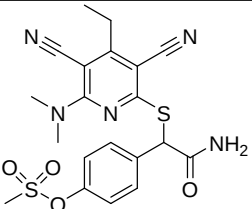
Condiciones finales del ensayo: HEPES 50 mM (Teknova. H1035), pH 8,0, MgCl₂ 2 mM (Sigma. M1028), DTT 1 mM (Sigma. D5545), NP40 tensioactivo Amps al 0,01% (Thermo Scientific. 28324), BSA al 0,01% (Ambion. AM2618), DNMT1 40 nM (DNMT1 humana truncada (601 a 1600. GSK de preparación interna), 3H-SAM 100 nM (American Radiolabeled Chemicals Inc. ART 0288), SAM fría 900 nM (New England Biolabs. B9003S) y 40-mer oligonucleótido de DNA hemimetilado 200 nM (Integrated DNA Technologies. 43334514).

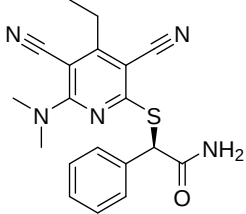
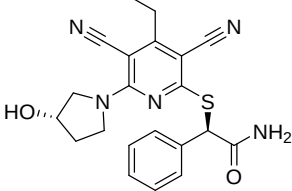
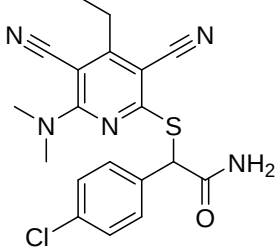
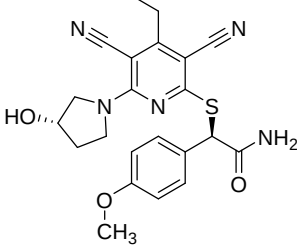
Solubilidad de compuestos sólidos en fluido intestinal simulado en estado de ayuno

La solubilidad de los compuestos sólidos en fluido intestinal simulado en estado de ayuno (FaSSIF) se determinó a pH 6,5 después de una equilibración de 4 horas a temperatura ambiente (utilizando los procedimientos descritos en Sou, T.; Bergström, C. A. S. Automated assays for thermodynamic (equilibrium) solubility determination. *Drug Discovery Today: Technologies* 2018, 27, 11-19). Se agregó 1 mL de tampón FaSSIF (taurocolato de sodio 3 mM, lecitina 0,75 mM en tampón de fosfato de sodio a pH 6,5) a un 1 mg de compuesto sólido pesado manualmente en un vial de 4 mL. La suspensión resultante se agitó a 900 rpm durante 4 horas a temperatura ambiente y luego se transfirió a una placa de filtro de solubilidad de 96 pocillos Multiscreen HTS para separar el sólido residual y el filtrado. Se realizó la cuantificación de la concentración del compuesto en el filtrado mediante HPLC-UV utilizando calibración de punto de una concentración

conocida del compuesto en DMSO. Un conjunto de 3 estándares internos de solubilidad conocida (Atovaquona, Nimesulida y Warfarina de 2,20 µg/mL y 140 µg/mL respectivamente) se analizaron junto a los compuestos para evaluar la idoneidad del proceso. El intervalo dinámico del ensayo fue de 1 µg/mL a 1000 µg/mL.

Resultados

Compuesto	Estructura	DNMT1 IC ₅₀ (nM)	Biodisponibilidad oral en rata (%)	Solubilidad de FaSSIF (µg/mL)
Ejemplo 1		16139 ^a		>1000
Ejemplo 2		54 ^a	40	1
Ejemplo 3		5209 ^a		>1000
Ejemplo 4		107 ^a		<1

Compuesto de referencia 1		89 ^a		<1
Compuesto de referencia 2		156 ^a		2,7
Compuesto de referencia 3		631 ^b		
Compuesto de referencia 4		79 ^b	6,1	4

^a DNMT1 de longitud completa

^b DNMT1 truncada

Estudios de farmacocinética: Todos los estudios se realizaron de conformidad con la política de GSK sobre el cuidado, bienestar y tratamiento de los animales de laboratorio y los revisaron el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en GSK o el proceso de revisión ética en la institución en la que se realizaron los estudios. Los estudios de farmacocinética para el Ejemplo 2 se realizaron utilizando ratas Wistar Han macho sin ayuno, n = 3/vía de dosis; y para el compuesto de referencia 4, ratas Sprague-Dawley macho sin ayuno, n = 2/vía dosis en un diseño no cruzado. Los compuestos se prepararon como soluciones en DMA al 5%/Solutol al 15% y se administraron como una infusión IV de

60 minutos y como alimentación gástrica vía oral. Se recogieron muestras de sangre de manera serial y en múltiples momentos desde la predosis hasta 24 horas después de la dosis, y se cuantificaron los analitos mediante LC/MS/MS. El porcentaje de biodisponibilidad se calculó por comparación del área bajo la curva normalizada según la dosis (DNAUC) obtenida mediante la administración de una dosis mediante PO con el DNAUC de la vía IV [(DNAUC de PO/DNAUC de IV)*100].

Métodos del estudio en ratones *in vivo*:

Se implantaron células SKM-1 ($3,8 \times 10^6$) suspendidas en Matrigel al 50% (BD Biosciences)/salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) al 50% en ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid}1NCrCrl hembra de entre 8 y 11 semanas de edad. Los tumores se midieron con calibres digitales y se aleatorizaron en bloques estratificados según el tamaño del tumor (valor de $P > 0,9085$) en grupos de tratamiento con volúmenes promedios de tumores de 219 mm^3 o 1076 mm^3 por eficacia o mediante estudios PK/PD respectivamente. Se formuló GSK4172239A semanalmente en agua estéril. Dos veces a la semana se midió el peso corporal y el tamaño del tumor de los ratones. La administración de la dosis comenzó al día siguiente de la aleatorización. A los animales se les administró una dosis dos veces al día (BID) mediante alimentación gástrica vía oral (PO) con el Ejemplo 1 a 22 mg/kg, 67 mg/kg o 200 mg/kg. Durante los estudios, no se superó una carga tumoral máxima $\geq 2500 \text{ mm}^3$ en dos mediciones consecutivas. Para el estudio PK/PD, se recogió tumor, sangre y médula ósea dos horas después de la dosis 20.^a (10 días). Para la PK, la sangre se mezcló 50:50 con agua mientras que el tumor se homogeneizó (homogeneizador de mano Omni) en agua estéril a una dilución 1:4. Ambas muestras se precipitaron con acetonitrilo y las concentraciones del Ejemplo 4 se determinaron mediante HPLC–MS/MS (Acquity uPLC de Waters, Sciex API5000). Se evaluaron las muestras de tumor SKM-1 y de médula ósea de ratón utilizando un ensayo LC-MS/MS de metilación global del DNA (5-metilcitosina). Se aisló el DNA utilizando el equipo Quick-DNA Miniprep (Zymo Research) según las instrucciones del

fabricante. Para cada muestra, se agregó DNA Degradase Plus (Zymo Research) según las instrucciones del fabricante a 1250 ng de DNA para liberar los nucleósidos individuales del DNA genómico. El DNA tratado con Degradase (10 µL) se combinó con 190 µL de solución de acetonitrilo/agua/hidróxido de amonio (90:10:0,1) que contenía 100 ng/mL de 2'-deoxicitidina-13C,15N2 (Toronto Research Chemicals) y con 10 ng/mL de estándares marcados de 5-Metil-2'-deoxicitidina-13C,15N2 (Toronto Research Chemicals). Un método HPLC–MS/MS se optimizó para cuantificar 2'-deoxicitidina y 5-metil-2'-deoxicitidina. Se separaron los analitos y los estándares marcados mediante HILIC (cromatografía líquida de interacción hidrofílica) utilizando una columna Acquity BEH Amide, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm² en una UPLC de Waters Acquity seguida por un análisis MS/MS en un Sciex API5000 utilizando una ionización por electrospray asistida por turbonebulización de ion positivo. Se determinaron las concentraciones de 2'-deoxicitidina y 5-metil-2'-deoxicitidina utilizando curvas estándares de 2'-deoxicitidina pura (Sigma-Aldrich) y 5-metil-2'-deoxicitidina (Santa Cruz Biotechnology). Las concentraciones de 5-metilcitosina se normalizaron a concentraciones totales de citosina para determinar el porcentaje de 5-metilcitosina. Los valores de las muestras tratadas se normalizaron según el vehículo de control.

Resultado del estudio en ratones *in vivo*:

Ejemplo 1 presenta actividad *in vivo*. Se evaluó el Ejemplo 1 en ratones inmunodeprimidos portadores de xenoinjertos subcutáneos de AML (leucemia mieloide aguda) humana SKM-1. A los animales se les administró una dosis dos veces al día (BID) mediante alimentación gástrica vía oral (PO) con el Ejemplo 1 a 22 mg/kg, 67 mg/kg o 200 mg/kg. Para examinar los cambios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD), se recogieron tumores, sangre y médula ósea dos horas después de la dosis 20.^a (10 días; n = 5 animales por grupo). La evaluación farmacocinética demostró que la exposición al fármaco (medida como la porción activa racémica del Ejemplo 4) era proporcional a la dosis y aproximadamente equivalente en la sangre y en el tumor. Además, la

consecuencia mecanicista de inhibir DNMT1, la disminución en la metilación del DNA, se evaluó globalmente utilizando un ensayo de 5-metilcitosina basado en LC-MS/MS. La metilación global del DNA se redujo con todas las dosis del Ejemplo 1, en comparación con el vehículo, con un cambio máximo del 49% en el tumor y del 47% en la médula ósea observado con el grupo de 200 mg/kg. En un estudio posterior, para examinar la eficacia antineoplásica, se midió el volumen del tumor (n = 10 animales por grupo) dos veces a la semana durante ≥ 4 semanas mientras se realizaba el tratamiento. El Ejemplo 1 indujo a una reducción dependiente de la dosis en el volumen del tumor; la inhibición del crecimiento tumoral osciló desde un promedio del 35%, en el grupo de 22 mg/kg, hasta una regresión marcada, en el grupo de 200 mg/kg, en comparación con el vehículo en el día 22; el último día el grupo del vehículo contenía 9 animales.